FRESENIUS'
ZEITSCHRIFT
FÜR ANALYTISCHE
CHEMIE

BEGRÜNDET VON REMIGIUS FRESENIUS

HERAUSGEGEBEN VON

W. FRESENIUS UND A. KURTENACKER

146. BAND
VIERTES HEFT
MIT 12 ABBILDUNGEN IM TEXT

SPRINGER-VERLAG BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
J. F. BERGMANN · MÜNCHEN
1955

Z.anal. Chem.

Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie.

Begründet 1862 und herausgegeben bis Band 20 (1881) von *C. Remigius Fresenius*, bis Band 36 (1897) von *C. Remigius* und *Heinrich Fresenius*, Band 37—58 herausgegeben von *Heinrich* und *Wilhelm Fresenius* und *Ernst Hinz*, Band 59 (1920) bis Band 105 von *Wilhelm Remigius* und *Ludwig Fresenius*, Band 105 (1936) von *Remigius* und *Ludwig Fresenius*, Band 106—127 (1944) von *Remigius Fresenius*, Band 128 (1948) herausgegeben von *A. Kurtenacker* und ab Band 129 (1949) von *W. Fresenius* und *A. Kurtenacker*.

Bis Band 58 (1919) Wiesbaden, C. W. Kreidel, Band 59—62 (1922) Wiesbaden, C. W. Kreidel und München, J. F. Bergmann, Band 53—127 (1944) München, J. F. Bergmann, ab Band 128 (1948) München, Bergmann und Berlin, Springer.

Die **„Zeitschrift für analytische Chemie"** erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials in Heften, die zu Bänden vereinigt werden. Der Preis des Bandes beträgt DM 54,—. Sie bringt als „Originalabhandlungen" selbständige Untersuchungen aus allen Gebieten der analytischen Chemie.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskripts und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Der „Bericht über die Fortschritte der analytischen Chemie" enthält, zum Teil in Form von Sammelberichten, kritische Referate über die auf den einzelnen Gebieten an anderer Stelle veröffentlichten Arbeiten über analytische Chemie.

Originalarbeiten und alle sie betreffenden Zuschriften sind zu richten an die

Redaktion der Zeitschrift für analytische Chemie,
Wiesbaden, Kapellenstraße 11/15.

Für Originalabhandlungen wird ein Unkostenersatz von DM 32,— je Druckbogen, jedoch nicht mehr als 1½ Druckbogen für einen Beitrag vergütet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 40 Sonderdrucke.

Auf möglichst rasche Veröffentlichung der eingelaufenen Arbeiten wird besonderer Wert gelegt.

J. F. Bergmann
München 27, Trogerstraße 56
Fernsprecher 40535

Springer-Verlag
Heidelberg, Neuenheimer Landstraße 24
Fernsprecher 2440
Berlin W 35, Reichpietschufer 20
Fernsprecher 249251

Band 146

Inhaltsverzeichnis.

Heft 4

Originalabhandlungen.

Seite

Pfeil, E., G. Ploss und **H. Saran,** Trennung der Schwefelwasserstoffgruppe mit Hilfe der Papierchromatographie. Mit 1 Textabbildung 241

Täufel, K., R. Pohloudek-Fabini und **U. Behnke,** Zur mikroanalytischen Bestimmung der Citronensäure in biologischen Substraten. Mit 2 Textabbildungen 244

Zeidler, H., Über die Verwendung einfacher Indicator- und Bezugselektroden bei potentiometrischen Titrationen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln. Mit 1 Textabbildung 251

Geilmann, W., und **K. Beyermann,** Die Bestimmung kleiner Mengen Mangandioxyd. Mit 2 Textabbildungen 254

Salzer, F., Die Bestimmung von Glyoxal und Glyoxylsäure. Mit 4 Textabbildungen 260

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Warenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Aus dem Chemischen Institut der Universität Marburg.

Trennung der Schwefelwasserstoffgruppe mit Hilfe der Papierchromatographie.

Von

EMANUEL PFEIL.

Mitbearbeitet von G. PLOSS und H. SARAN.

Mit 1 Textabbildung.

(*Eingegangen am 10. Dezember 1954.*)

Die Papierchromatographie bietet ohne Zweifel für die anorganische qualitative Analyse eine Reihe von Vorteilen, unter die nicht zuletzt die Möglichkeit zu rechnen ist, eine größere Zahl von Analysen gleichzeitig auszuführen. Dadurch kann der Nachteil der längeren Analysendauer wieder ausgeglichen werden. Damit aber die Papierchromatographie wirklich an Stelle des jetzt gebräuchlichen Analysenganges eingeführt werden kann, muß man verlangen, daß das Arbeitsverfahren einfach und sicher und die Zahl der in einem Gang zu trennenden Ionen möglichst groß ist.

Zweckmäßig hält man sich bei der Gruppeneinteilung an die herkömmliche Gliederung in H_2S-$(NH_4)_2S$-, Ammoniumcarbonat- und Alkaligruppe. In der Literatur ist bereits ein Verfahren bekanntgeworden, das die gleichzeitige Trennung aller Ionen der Ammoniumcarbonat- und Alkaligruppe erlaubt[4]. Teiltrennungen einzelner Fraktionen der Schwefelwasserstoffgruppe sind von F. H. POLLARD, J. F. W. MCOMIE und I. I. ELBEIH[2] beschrieben worden. (Ag, Hg^{I}, Hg^{II}, As, Cu, Cd, Sn^{II}, und Sn^{IV}, Lösungsmittel: 0,1 n Salpetersäure-Benzoylaceton; Ag, Cu, Cd, As, Sb, Lösungsmittel: 0,4 n Salpetersäure-Collidin.) F. H. POLLARD, J. F. W. MCOMIE und H. M. STEVENS[3] versuchen die Auftrennung der gesamten Schwefelwasserstoffgruppe mittels Dioxan-Antipyrin-Salpetersäure als Lösungsmittel. Dabei besitzen Pb, Cd und As nahezu identische R_f-Werte. Hg, Cd, Bi, Pb und Cu lassen sich mit Hilfe von Butanol-3 n Salzsäure trennen[1], As, Sb und Sn mittels Acetylaceton-Wasser-Salzsäure-Aceton[1].

Bis auf den nicht recht geglückten Versuch von POLLARD, MCOMIE und STEPHENS scheint die Trennung der gesamten Schwefelwasserstoffgruppe nirgends beschrieben worden zu sein, obwohl gerade für die analytische Praxis die papierchromatographische Trennung erst dann überhaupt brauchbar wird, wenn jeweils alle Ionen einer Gruppe nebeneinander nachgewiesen werden können.

Als günstiges Lösungsmittel für die H_2S-Gruppe hat sich Butanol erwiesen, das mit 3,4 n bis 3,5 n Salzsäure gesättigt wird, als Papier hat sich Nr. 2043b von Sch. & Sch. ausgezeichnet bewährt. Die gefundenen R_f-Werte zeigt Tab. 1.

Tabelle 1. *R_f-Werte der Ionen der H_2S-Gruppe in Butanol, mit 3,4 n Salzsäure gesättigt; aufsteigende Arbeitsweise.*

Hg^{II} 0,86	As^{V} 0,78	Pb^{II} 0,28
Sn^{IV} 0,83	Bi^{III} 0,60	Cu^{II} 0,19
Cd^{II} 0,79	Sb^{V} 0,34	Ag^{I} 0,00

Da für Spezialaufgaben auch andere Butanol-Salzsäureverhältnisse von Vorteil sein können, geben wir in Abb. 1 die Abhängigkeit der R_f-Werte von der Konzentration der Salzsäure wieder.

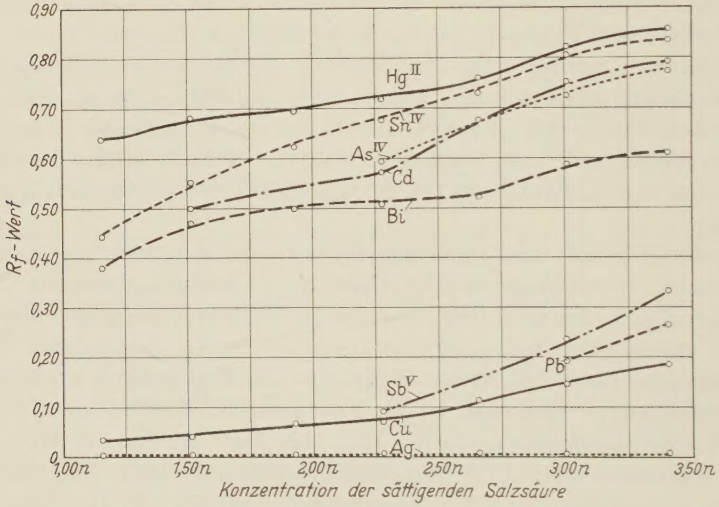


Abb. 1. R_f-Werte der H_2S-Gruppe in Abhängigkeit von der Konzentration der zur Sättigung des Butanols verwendeten Salzsäure; aufsteigende Arbeitsweise; Papier 2043b von Sch. & Sch.

Hg, Sn, As und Sb müssen in den höchsten Oxydationsstufen aufgetragen werden. Blei neigt wegen der geringen Löslichkeit des Chlorids bei Mengen über 10 μg zur Schwanzbildung. Die besten Chromatogramme erhielten wir, wenn wir von den übrigen Elementen 20—50 μg je Startfleck auftrugen.

Da kein Reagens bekannt ist, welches mit allen Elementen der H_2S-Gruppe gleichmäßig gut reagiert, muß die Entwicklung der Chromatogramme in mehreren Abschnitten vorgenommen werden. Wir wählten die Reagentien so aus, daß sie auf dem gleichen Chromatogramm übereinander angewandt werden können, so daß es nicht nötig ist, von der

gleichen Analyse mehr als 1 Tropfen aufzutragen. Durch Anwendung spezifischer Reagentien läßt sich die Trennung nahe beieinanderliegender Ionen verbessern. Zur Entwicklung benötigt man:

0,2%ige Kaliumjodidlösung in Sprühflasche; konz. Salzsäure in Sprühflasche; 0,2 n Schwefelammoniumlösung in Sprühflasche; 0,1%ige alkohol. Quercetinlösung in Sprühflasche; konz. Ammoniak in Räucherschale oder Sprühflasche.

Zuerst wird das gut getrocknete Chromatogramm mit der KJ-Lösung besprüht. Es erscheinen:

Hg rot, bei Überschuß von Reagens gelb; Bi braun, bei Überschuß von Reagens gelb; Sb braun (Jodausscheidung); Cu braun (Jodausscheidung); Pb schwach gelb.

Man trocknet wieder bei 60° C. Sofern dabei nicht schon Arsen als brauner Jodfleck sichtbar wird, besprüht man die Gegend um R_f 0,8 mit konz. Salzsäure. Nach kurzer Zeit erscheint As. Man trocknet wieder und räuchert über der Schale mit Ammoniak, bis der von As hervorgerufene Flecken wieder verschwunden, das Papier also wieder alkalisch geworden ist. Beim Besprühen mit Schwefelammoniumlösung kommt:

Hg schwarz,	Pb schwarz,
Cd gelb,	Cu braunschwarz,
Bi braun,	Ag schwarz.

Zum Nachweis des Zinns wird gut übergetrocknet, mit Quercetinlösung besprüht, wieder getrocknet und mit konz. Ammoniak geräuchert oder besprüht. Nach dem Trocknen erscheint Zinn als gelber Fleck[4]. Silber wird wegen der Lichtempfindlichkeit seines Chlorids im allgemeinen schon während des Laufes als violettgrauer Fleck sichtbar, gegebenenfalls legt man kurz in helles Tageslicht.

Da keines der Ionen die Wanderung eines anderen im Chromatogramm stört, können die Nachweisbarkeitsgrenzen nur die der Empfindlichkeit der verwendeten Reagentien sein. Nach dem vorgeschlagenen Verfahren lassen sich neben je 100 μg der übrigen Elemente der H_2S-Gruppe noch nachweisen:

2 μg Hg	2 μg Sb
10 μg Sn	1,5 μg Cu
5 μg Cd	3 μg Pb
0,5 μg As	5 μg Ag
3 μg Bi	

Die obere Grenze von 100 μg der Begleitelemente wurde aus praktischen Gründen gewählt, eine wirkliche Störung der Nachweisreaktionen dürfte erst bei sehr viel höheren Konzentrationen eintreten.

Literatur.

[1] Burstall, F. H., G. R. Davies, R. P. Linstead and R. A. Wells: J. chem. Soc. (London) **1950**, 516; vgl. diese Z. **137**, 36 (1952/53). — [2] Pollard, F. H., J. F. W. McOmie and I. I. Elbeih: J. chem. Soc. (London) **1951**, 466, 470; vgl. diese Z. **136**, 279 (1952). — [3] Pollard, F. H., J. F. W. McOmie and H. M. Stevens: J. chem. Soc. (London) **1951**, 771; vgl. diese Z. **136**, 280 (1952). — [4] Weiss, A., u. S. Fallab: Helv. chim. Acta **37**, 1253 (1954).

Doz. Dr. E. Pfeil, Marburg/Lahn, Bahnhofstraße 7.

Aus dem Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke.

Zur mikroanalytischen Bestimmung der Citronensäure in biologischen Substraten.

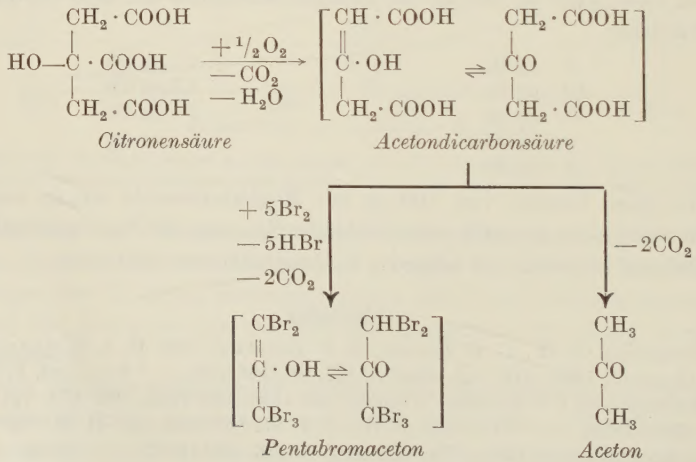
Von

K. Täufel, R. Pohloudek-Fabini und U. Behnke.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. März 1955.)

Wenn man sich mit Untersuchungen über die Biogenese der Citronensäure in pflanzlichen und tierischen Geweben sowie über ihr weiteres Schicksal befaßt, sieht man sich wegen der oft sparsamen Verteilung dieser stoffwechselchemisch wichtigen Säure und dem oft nur beschränkt zur Verfügung stehenden Versuchssubstrat vor die Notwendigkeit gestellt, Mengen in der Größenordnung von 10—100 μg reproduzierbar und zuverlässig zu bestimmen. Die hierfür nach dem Schrifttum der letzten 25 Jahre in Betracht zu ziehenden Arbeitsweisen gründen sich auf die gelenkte Umformung der Säure über Acetondicarbonsäure entweder in Aceton oder in Pentabromaceton. Das Aceton wird jodometrisch[5, 9, 17, 20] bzw. photometrisch mit Salicylaldehyd[8] ermittelt; das Pentabromaceton kann gravimetrisch[15], titrimetrisch[3, 4, 7, 14, 16] oder photometrisch erfaßt werden, wobei sich im Falle sehr kleiner Konzentrationen nur die letzten Methoden durchgesetzt haben.



Bei unseren seitherigen Versuchen[12, 18, 19] hat sich das Verfahren nach G. W. Pucher, C. C. Sherman u. H. B. Vickery[13] bewährt. In An-

wesenheit größerer Mengen von Stoffen, die Kaliumpermanganat reduzieren (z.B. der Kohlenhydrate in Honig, Sirup, süßen Getränken usw.), sind Störungen zu erwarten; diese werden durch Anwendung des Wismutnitrat-Mannitreagenses (Abtrennung der Citronensäure von der Hauptmenge der störenden Begleitstoffe) in der früher beschriebenen Weise überwunden[12, 18, 20].

Die von G. W. Pucher u. Mitarb. entwickelte Arbeitstechnik ist seit ihrer Publikation mehrfach Gegenstand der kritischen Überprüfung und weiteren Ausgestaltung gewesen. Es wird in der Literatur über viele Versuche hinsichtlich des Einflusses der anzuwendenden Reagentien zur Erhöhung der Stabilität und Eindeutigkeit der auszuwertenden Farbe, zur optimalen Festlegung aller Einzeloperationen, zur Steigerung der Empfindlichkeit usw. berichtet[1, 2, 6, 10, 11, 21–24], wobei sich mitunter nicht unerhebliche Differenzen in den Angaben manifestieren.

Bei eigenen Untersuchungen hat sich gezeigt, daß z. B. Petroläther verschiedener Herkunft zu recht unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Als von sehr großem Einfluß hat sich ferner insbesondere die Beschaffenheit des verwendeten Natriumsulfides erwiesen. Während ein technisches Präparat nach bloßer Filtration der hergestellten Lösung diskutable Resultate geliefert hat (nach etwa 10 Tagen ist eine Natriumsulfidlösung nicht mehr brauchbar), sind bei einem Produkt p. a. Fehlbeträge von mehr als 20% feststellbar (Tab. 1) gewesen.

Tabelle 1. *Prüfung verschiedener Natriumsulfidlösungen hinsichtlich Eignung zur Citronensäurebestimmung.*
Vorgelegt: 0,500 mg Citronensäure.

Alter der wäßrigen Na_2S-Lösung Tage	Na_2S-Lösung (techn.)		Na_2S-Lösung (p. a.)	
	Citronensäure, gefunden		Citronensäure, gefunden	
	mg	%	mg	%
1	0,516	103,2	0,386	77,2
2	0,523	104,6	0,396	79,2
4	0,505	101,0	0,355	71,0
5	0,501	100,2	0,361	72,2
8	0,495	99,0	0,354	70,8
9	0,503	100,6	0,393	78,6
11	0,514	102,8	0,397	79,4
12	0,487	97,4	0,374	74,8
15	0,451	90,2	0,357	71,4
16	0,453	90,6	0,371	74,2
17	0,471	94,2	0,396	79,2
18	0,464	92,8	0,373	74,6
19	0,441	88,2	0,346	69,2

Unter kritischer Auswertung des Schrifttums und Heranziehung eigener Erfahrungen wurde die nachstehend beschriebene Arbeitsweise

für den Bereich von etwa 10—100 μg Citronensäure entwickelt. Sie ist bereits vielfach bei der Untersuchung von biologischem Material, vor allem von Blut mit gutem Erfolg angewendet worden.

Experimentelles*.

Erforderliche Reagentien (soweit erhältlich p. a.-Qualität).

20%ige Trichloressigsäurelösung,
50%ige Schwefelsäure,
40%ige Metaphosphorsäurelösung,
12%ige Kaliumbromidlösung,
5%ige Kaliumpermanganatlösung,
3%ige Wasserstoffperoxydlösung,

Petroläther, Siedebereich 40—70° C. — Reinigungsvorschrift: 3 l Alkohol, worin etwa 2—3 g Kupferphthalocyanin als Katalysator aufgeschlämmt sind, werden zu etwa 20 l Petroläther gegeben. Diese Mischung wird mit Natrium in kleinen Stückchen bis zur starken Wasserstoffentwicklung versetzt und dies täglich einmal wiederholt, und zwar so lange, bis die Wasserstoffentwicklung praktisch aufhört. Nach etwa 5tägigem Stehen wird aus dem Gemisch durch fraktionierte Destillation die Fraktion von 40—70° C abgetrennt; sie wird bei den Versuchen verwendet.

2%ige wäßrige Natriumsulfidlösung ($Na_2S \cdot 9\,H_2O$).

Stammlösung Citronensäure: 0,5 g Citronensäure, p. a., werden mit n H_2SO_4 auf 1000 ml aufgefüllt; diese Lösung ist viele Wochen haltbar.

Arbeitsvorschrift.

Etwa 2 ml durch Oxalat stabilisiertes Blut (Oxalatstammlösung: 1,2 g Ammoniumoxalat + 0,8 g Kaliumoxalat + 98 g Wasser; davon dampft man 0,2—0,3 ml zur Trockne ein und mischt mit 2—3 ml Blut gut durch) werden in einem Meßkolben von 15 ml mit 5 ml Wasser und mit 20%iger wäßriger Trichloressigsäure nicht ganz bis zur Marke aufgefüllt, gut durchgemischt und 10 min im Wasserbad bei 90° C gehalten. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur füllt man mit Wasser bis zur Marke auf und zentrifugiert den Inhalt des Kolbens im Zentrifugenglas 5 min bei 3000 U/min. Die überstehende Lösung wird durch einen kleinen Büchner-Trichter mit hartem Filter abgesaugt. Vom Filtrat werden genau 10 ml in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben mit 1 ml 50%iger Schwefelsäure versetzt und bei kleiner Flamme auf etwa 6 ml eingedampft; zur Vermeidung von Siedeverzügen gibt man ein Siedesteinchen hinzu. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird der Inhalt des Kölbchens durch einen kleinen Trichter mit Siebplatte (zum Zurückhalten des Siedesteinchens) in einen 30—50 ml Schütteltrichter gebracht. Man spült 3mal mit wenig Wasser nach, so daß das Volumen im Schütteltrichter 10 ml möglichst nicht überschreitet. Man versetzt die Lösung mit 0,25 ml 40%iger wäßriger Metaphosphorsäure, 0,5 ml 12%iger Kaliumbromidlösung und 2 ml 5%iger Kaliumpermanganatlösung und läßt 10 min lang stehen. Nach Entfärben mit 3%iger Lösung von Wasserstoffperoxyd (Verbrauch etwa 1,5 ml; Überschuß vermeiden) schüttelt man mit 6 ml Petroläther (Siedepunkt 40—70° C) 1 min kräftig durch, wartet 3 min bis zur vollständigen Trennung der beiden Phasen und läßt dann die untere (wäßrige) Schicht abfließen. Anschließend wird der Petroläther 2mal mit je 5 ml Wasser unter

* Die Arbeitsvorschrift ist auf die Untersuchung von Blut zugeschnitten; bei sinngemäßer Abwandlung ist sie auf andere Substrate anwendbar. Es ist Sorge zu tragen, daß im eingesetzten Versuchsmaterial Mengen an Citronensäure zwischen 10—100 μg enthalten sind.

kräftigem Durchschütteln gewaschen, wobei jedesmal zur vollständigen Phasentrennung 3 min gewartet und dann erst die wäßrige Schicht abgelassen wird. Der dergestalt vorbereitete Petrolätherextrakt wird mit genau 6 ml 2%iger Lösung von Natriumsulfid versetzt, 1 min kräftig durchgeschüttelt und zur Phasentrennung 5 min stehen gelassen. Man überführt nun die schwach gelb gefärbte, wäßrige Schicht mit Hilfe einer Pipette in ein Zentrifugengläschen und zentrifugiert 1 min lang bei 3000 U/min. Die Lösung, die jetzt völlig klar sein muß, wird in die Küvette gefüllt und 20 min nach dem Ausschütteln gegen die entsprechende Natriumsulfidlösung als Vergleichslösung photometriert.

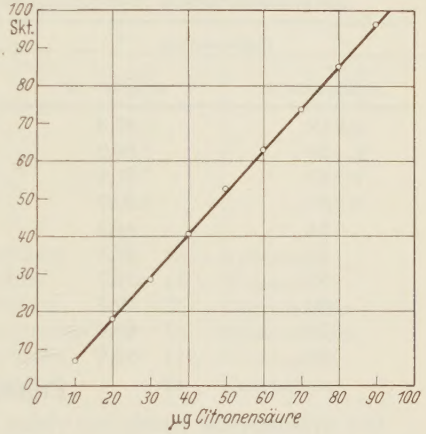


Abb. 1.
Eichkurve zur photometrischen Bestimmung der Citronensäure als Pentabromaceton.

Bei unseren Messungen wurden das „Lichtelektrische Colorimeter nach Dr. B. Lange" mit einer Lampe von 6 V und 30 W, mit Metallinterferenzfiltern ($\lambda_{max} \approx 450\,m\mu$, Hwbr. $\approx 10\,m\mu$), mit 5 ml-KPG-Gläsern als Küvetten und das Multiflexgalvanometer MG 2 benutzt. Die Nullstellung wird mit 2%iger wäßriger Lösung von Natriumsulfid und die 100-Stellung mit Hilfe eines Standardfarbglases (GG 4; 1 mm dick; erhältlich bei VEB Schott u. Gen., Jena) oder mit einer Alizarinvergleichslösung festgelegt. Diese stellt man durch Lösen von 0,1 g Alizarin S in 1000 ml Wasser und anschließendes Verdünnen von 25 ml dieser Lösung mit 75 ml 0,1 n Salzsäure her. Die Null- und die 100-Stellung müssen vor jeder Messung kontrolliert werden. Man stellt sich die Eichkurve für die Auswertung der experimentellen Ergebnisse für den Bereich von 10—100 μg reine Citronensäure auf (Abb. 1).

Im vorliegenden Gebiet der stark verdünnten gefärbten Lösungen besteht nach Abb. 1 annähernd direkte Proportionalität zwischen Konzentration und Extinktion; es handelt sich hier um Extinktionen zwischen etwa 0 und 0,13. Berücksichtigt man, daß die Methode im Bereich von 10—100 μg nach unseren Erfahrungen eine Fehlerbreite von etwa $\pm$ 3 μg hat und daß die von Natur aus immer vorhandene biologische Schwankungsbreite des Untersuchungsmaterials diejenige der Methode im allgemeinen übertrifft, so ist zu folgern, daß praktisch kein Fehler entsteht, wenn man den Galvanometerausschlag statt an einer Extinktionsskala an einer beliebigen linearen Skala abliest. Es erscheint somit verständlich, daß die Eichkurve (Abb. 1) gegen eine lineare 100teilige Skala praktisch eine Gerade ergibt.

Die Werte für die Eichkurve sind Mittelwerte aus jeweils 4—5 Bestimmungen. Um die Reproduzierbarkeit der Arbeitsweise sicherzustellen, ist es erforderlich, etwa alle 2—4 Wochen Kontrollbestimmungen mit einer Standardlösung von Citronensäure auszuführen, die man durch

entsprechende Verdünnung der Stammlösung erhält. Es ergibt sich eine Fehlerbreite von absolut etwa $\pm 3\,\mu g$ Citronensäure für den ganzen Eichkurvenbereich (Tab. 2).

Tabelle 2. *Kontrolluntersuchungen an Hand der Eichkurve zur photometrischen Bestimmung der Citronensäure als Pentabromaceton.*

Citronensäure		Schwankungsbreite	
vorgegeben μg	gefunden μg	μg	%
18	17,3	— 0,7	— 3,9
20	19,2	— 0,8	— 4,0
27	27,1	+ 0,1	+ 0,4
30	30,7	+ 0,7	+ 2,3
34	34,4	+ 0,4	+ 1,1
45	43,4	— 1,6	— 3,6
52	54,7	+ 2,7	+ 5,2
60	59,5	— 0,5	— 0,8
70	69,9	— 0,1	— 0,1
80	82,8	+ 2,8	+ 3,5

Ergebnisse.

Die Arbeitsweise wurde bei vielen Untersuchungen von Blut (normale Ratten) angewendet und durch Zugabe von bekannten Mengen von Citronensäure auf die Reproduzierbarkeit überprüft; in Tab. 3 sind einige Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 3. *Photometrische Bestimmungen von Citronensäure als Pentabromaceton im Rattenblut mit und ohne Zusatz von Citronensäure.*

Citronensäure		Citronensäure			
ermittelt, ohne Zusatz μg	zugesetzt μg	gefunden, mit Zusatz μg	gefunden, nach Abzug der zugesetzten Menge μg	Schwankungsbreite (Spalte 4 — Spalte 1) μg	%
1	2	3	4	5	6
25,6	6,7	32,9	26,2	+ 0,6	+ 2,3
18,7	11,8	32,3	20,5	+ 1,8	+ 9,6
20,7	13,3	36,9	23,6	+ 2,9	+ 14,0
21,5	15,6	35,6	20,0	— 1,5	— 7,0
33,8	30,0	64,3	34,3	+ 0,5	+ 1,5
36,5	40,0	76,0	36,0	— 0,5	— 1,4
30,3	50,0	82,1	32,1	+ 1,8	+ 5,9

Zur Sicherstellung ihrer Spezifität mußte die Arbeitsweise im Hinblick auf die im biologischen Material zu erwartende Anwesenheit anderer organischer Säuren überprüft werden. Zu diesem Zwecke wurden zu einer wäßrigen Lösung von 50 μg Citronensäure jeweils 100 μg der betreffenden Säure zugegeben und die resultierende Farbe gemessen. Wie Tab. 4 lehrt, verursachte keine der geprüften, nachstehend angegebenen 18 organischen Säuren einen die Norm überschreitenden Fehler.

Tabelle 4. *Spezifität der photometrischen Bestimmung der Citronensäure als Pentabromaceton bei Gegenwart anderer organischer Säuren.*

Vorgegebene Mengen: Citronensäure 50 μg. Andere organische Säuren je 100 μg.

Art der vorgegebenen Säuren	Citronensäure, gefunden	Schwankungsbreite der gefundenen Citronensäure	
	μg	μg	%
1 + 2 bis 4	47,8	— 2,2	— 4,4
1 + 2 bis 7	47,5	— 2,5	— 5,0
1 + 2 bis 10	48,6	— 1,4	— 2,8
1 + 2 bis 14	49,4	— 0,6	— 1,2
1 + 2 bis 17	49,3	— 0,7	— 1,4
1 + 2 bis 18	48,6	— 1,4	— 2,8

1 — Citronensäure
2 — Essigsäure
3 — Glykolsäure
4 — Glyoxylsäure
5 — Milchsäure
6 — Brenztraubensäure
7 — Fumarsäure
8 — Oxalsäure
9 — Malonsäure
10 — Bernsteinsäure
11 — Glutarsäure
12 — Adipinsäure
13 — Äpfelsäure
14 — Weinsäure
15 — Citraconsäure
16 — Mesaconsäure
17 — Aconitsäure
18 — Itaconsäure

Die Beständigkeit der durch Natriumsulfid verursachten Farbe beim Ausschütteln der petrolätherischen Lösung von Pentabromaceton ist in der Literatur immer wieder Gegenstand von Diskussionen. Bei unserer Arbeitsweise reichte die Stabilität der schwach gelben Farbgebung für die Durchführung der Messungen aus, wie die Zeit-Intensität-Kurven nach Abb. 2 zum Ausdruck bringen. Nach einem anfangs relativ steilen Anstieg in der Farbtiefe wird nach 20—25 min praktisch ein Maximum erreicht; späterhin erfolgt allmähliches Abblassen.

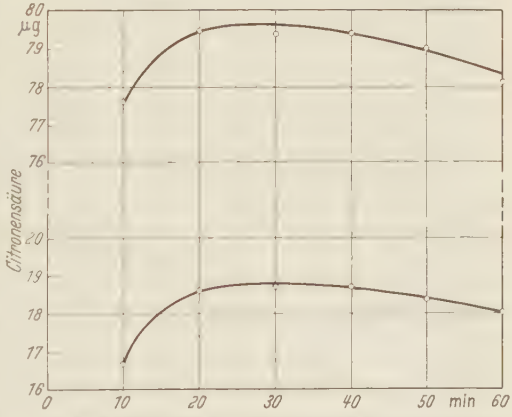


Abb. 2. Abhängigkeit der Farbintensität von der Zeit nach dem Ausschütteln mit Natriumsulfidlösung bei der photometrischen Bestimmung der Citronensäure als Pentabromaceton*.

Bei unserer Arbeitsweise wird deshalb unter Beachtung dieser Tatsache die Messung 20—25 min nach dem Ausschütteln mit Natriumsulfid durchgeführt. Unter diesen Umständen kann man

* Es handelt sich bei den beiden Zeit-Farbintensität-Kurven um solche, deren eine unter Zugrundelegung von 20 μg, deren andre unter Zugrundelegung von 80 μg Citronensäure erhalten worden sind.

sowohl auf die Zugabe eines besonderen Stabilisators (z. B. Pyridin[13], Glykol[6], Glycerin[1] usw.) als auch auf eine Abkühlung der Lösung verzichten[10]; sämtliche Arbeitsgänge werden bei Zimmertemperatur vorgenommen.

Zusammenfassung.

1. Unter Auswertung des Schrifttums der letzten 25 Jahre werden die Verfahren zur Bestimmung der Citronensäure durch Überführung in Aceton bzw. Pentabromaceton kritisch erörtert.

2. Es wird unter Abwandlung der Methode von G. W. Pucher, C. C. Sherman u. H. B. Vickery eine Arbeitsweise zur quantitativen Erfassung der Citronensäure in biologischem Material für den Bereich von 10—100 μg beschrieben.

3. An Hand von Beleganalysen werden die auf das Ergebnis einflußnehmenden Faktoren, ferner die Fehlerbreite, Reproduzierbarkeit und Spezifität der Methode diskutiert.

Literatur.

[1] Coppens, R.: Bull. Inst. agronom. Stat. Rech. Gembloux **17**, 16 (1948/49). — [2] Ettinger, R. H., L. R. Goldbaum and L. H. Smith jr.: J. biol. Chemistry **199**, 531 (1952); vgl. diese Z. **143**, 392 (1954). — [3] Goldberg, S. A., and A. R. Bernheim: J. biol. Chemistry **156**, 33 (1944). — [4] Hargreaves, C. A., M. D. Abrahams and H. B. Vickery: Analyt. Chemistry **23**, 467 (1951); vgl. diese Z. **135**, 385 (1952). — [5] Heiduschka, H., u. H. Sommer: Pharm. Zentralhalle Deutschland **76**, 593 (1935); vgl. diese Z. **115**, 157 (1938/39). — [6] Hunter, E., and L. P. Leloir: J. biol. Chemistry **159**, 295 (1945). — [7] Kometiani, P. A., u. G. G. Sturua: Biochemie (russ.) **1948**, 23. — [8] Krog, P. W.: Acta physiol. scand. **9**, 68 (1945). — [9] Messinger, J.: Ber. dtsch. chem. Ges. **21**, 3366 (1888); vgl. diese Z. **29**, 696 (1890). — [10] Natelson, S., J. K. Lugovoy and J. B. Pincus: J. biol. Chemistry **174**, 597 (1947). — [11] Natelson, S., J. B. Pincus and J. K. Lugovoy: J. biol. Chemistry **175**, 745 (1948). — [12] Pohloudek-Fabini, R.: Studien über die Chemie und Physiologie der Citronensäure (im Druck). Berlin: Verlag Technik 1955. — [13] Pucher, G. W., C. C. Sherman and H. B. Vickery, J. biol. Chemistry **113**, 235 (1936); vgl. diese Z. **110**, 314 (1937). — [14] Pucher, G. W., H. B. Vickery and C. S. Leavenworth: Ind. Engng. Chem. **6**, 190 (1934); vgl. diese Z. **112**, 231 (1938). — [15] Reichard, O.: diese Z. **99**, 81, 161 (1934); Z. Unters. Lebensmittel **68**, 138 (1934); **72**, 50 (1936); vgl. diese Z. **99**, 138 (1934). — [16] Sjöström, G., u. E. Emilsson: Svensk kem. Tidskr. **57**, 187 (1945). — [17] Täufel, K. u. F. Mayr: diese Z. **93**, 1 (1933). — [18] Täufel, K., u. R. Pohloudek-Fabini: Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. (im Druck). — [19] Täufel, K., u. R. Pohloudek-Fabini: Biochem. Z. (im Druck). — [20] Täufel, K., u. K. Schoierer: Z. Unters. Lebensmittel **71**, 297 (1936). — [21] Taussky, H. H.: J. biol. Chemistry **181**, 195 (1949); vgl. diese Z. **132**, 453 (1951). — [22] Taussky, H. H., and E. Shorr: J. biol. Chemistry **169**, 103 (1947); vgl. diese Z. **132**, 453 (1951). — [23] Taylor, T. G.: Biochemic. J. **54**, 48 (1953). — [24] Weil-Malherbe, H., and A. D. Bone: Biochemic. J. **45**, 377 (1949); vgl. diese Z. **132**, 319 (1951). —

Prof. Dr. K. Täufel, Potsdam-Rehbrücke, Straße der Freiheit 114—116.

Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Knöll).

Über die Verwendung einfacher Indicator- und Bezugselektroden bei potentiometrischen Titrationen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln.

Von
Hans Zeidler.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 10. März 1955.)

1. Nachteile der Glaselektrode bei potentiometrischen Titrationen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln.

Bei Verwendung von Glaselektroden für Potentialmessungen in organischen Lösungsmitteln muß die Elektrode mehrere Tage im betreffenden Lösungsmittel „eingequollen" werden[2]. Dieses Einquellen ist auch nicht zu umgehen, wenn die Elektrode zu Relativmessungen verwendet wird, wie es bei potentiometrischen Titrationen üblich ist. Die Vorversuche zur Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittels für eine bestimmte Titration werden dadurch erschwert. Ein Beispiel für einen methodisch bedingten, häufigen Lösungsmittelwechsel ist die Amintitration. Der Gesamtamingehalt eines Gemisches kann durch eine Titration in Eisessig bestimmt werden[3]. Bei Verwendung von Essigsäureanhydrid als Lösungsmittel wird bei einer Titration nur das tertiäre Amin erfaßt, weil primäres und sekundäres Amin acetyliert werden und die annähernd neutralen Acetylverbindungen unerfaßt bleiben[1]. Durch den Lösungsmittelwechsel bei einer solchen Differenztitration konnte ein Versagen der in Essigsäureanhydrid eingequollenen Glaselektroden beobachtet werden. Es zeigte sich, daß bei Verwendung von einer Elektrode für jedes Lösungsmittel nach kurzer Einwirkungszeit eines geringen Perchlorsäureüberschusses in der austitrierten Probe bei der folgenden Titration eine Verflachung oder ein Ausbleiben des Potentialsprunges zu verzeichnen war. Da flache Potentialsprünge nur ungenau auswertbar sind, bei unserer Aminbestimmung aber geringe Mengen von sekundärem Amin neben tertiärem bestimmt werden sollten, war die Glaselektrode ungeeignet.

2. Die Verwendung von Metallelektroden.

Eine relative Potentialanzeige mit Metallelektroden in organischen Lösungsmitteln ist in vielen Fällen ohne Zusatz von Chinhydron oder Chloranil als Redoxsystem möglich.

Für die Indicatorelektrode sind folgende Metalle geeignet: Gold, Platin, Antimon, Wismut und u. U. Nickel. Außerdem kann der Potentialverlauf auch mit einem Kohlenstoff-(Graphit)-Stab aufgenommen werden. Bei einem Vergleich erwies sich eine Goldelektrode mit etwa 1 cm^2 Gesamtoberfläche als am besten geeignet für potentiometrische Amintitrationen in Methanol, Äthanol, Propanol, Butanol, Acetonitril, Eisessig und Essigsäureanhydrid. Für derartige Titrationen sind folgende Metalle nicht brauchbar: Silber, Zinn, Eisen, Zink, Aluminium und Kupfer.

Ein Zusatz von Chinhydron erscheint zweckmäßig, wenn der Potentialsprung in Gegenwart größerer Mengen bereits neutralisierten Amins stattfindet. Das ist bei hohen Einwaagen der Fall und bei der Bestimmung von Äthylenoxyd[3], wobei Aminhydrochlorid im Überschuß vorgelegt wird, welches sich mit Äthylenoxyd zu Chlorhydrin und einer äquivalenten Menge basischem Amin umsetzt.

3. Kalomel- und Capillarelektroden bei Titrationen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln.

Die Kalomelelektrode als Bezugselektrode hat bei Verwendung von Acetanhydrid als Lösungsmittel den Nachteil, daß an der Elektrodengrenzfläche eine Wärmeentwicklung stattfindet. Durch die chemische Umsetzung des Anhydrids mit der wäßrigen Elektrodenfüllung werden die Diffusionsvorgänge an der Berührungsfläche unregelmäßig gestört. Dieser Nachteil kann durch Verwendung einer Quecksilber Quecksilber(I)-acetat-Elektrode[5] beseitigt werden, jedoch ist eine solche Elektrode für potentiometrische Titrationen nicht unbedingt erforderlich, weil es nur auf ein unveränderliches Potential während der Titration ankommt. Die Nachteile eines wäßrigen Bezugssystems werden durch Verwendung der sogenannten Capillarelektrode[4,6] ausgeschaltet. Durch die Abtrennung von etwas Anfangslösung in den durch eine Capillare abgetrennten Raum wird die Titration mit einem Fehler behaftet, welcher bei 0,01 n Vorlagen vernachlässigt werden kann. Bei Titrationen in organischen Lösungsmitteln können etwa 0,05 n Lösungen vorgelegt werden, und bei diesen relativ konzentrierten Lösungen ist der Fehler, welcher durch die Reservierung in der Capillare auftritt, nicht mehr zu vernachlässigen.

4. Bezugselektrode für Titrationen in nicht wäßrigen Medien.

Es wurde eine Bezugselektrode entwickelt, welche in ihrem Prinzip der Capillarelektrode ähnlich ist. Sie besitzt nicht die im vorigen Abschnitt aufgezeigten Nachteile einer solchen Elektrode und kann deshalb auch für potentiometrische Halbmikrobestimmungen verwandt werden.

Um die Abtrennung von Anfangslösung zu vermeiden, wurde die Bezugselektrode in Eisessig eingesetzt. Durch Verwendung einer G 4-Fritte (1 cm Durchmesser) an Stelle der Capillare wurde der Zellen-

widerstand stark vergrößert, so daß Messungen mit dem RFT-p_H-Meßgerät Typ 158 (Eingangswiderstand etwa 15 MΩ) nicht mehr möglich waren. Eine Sättigung des Eisessigs mit KCl beseitigte vorübergehend diese Schwierigkeit. Durch die Ausfällung von Kaliumperchlorat in den Frittenporen bei Verwendung von Perchlorsäure als Titrationsmittel erwies sich, daß KCl als Leitfähigkeitszusatz nicht geeignet war. Die Hydrochloride verschiedener Amine, Hydroxylammoniumchlorid und verschiedene Schwermetallacetate waren als Leitfähigkeitszusätze geeignet, wobei mit einer gesättigten Kupferacetat-Eisessiglösung die besten Resultate erzielt wurden. Selbst größere Mengen Kupferacetat in der Titrierflüssigkeit bedingten keinen Mehrverbrauch an Perchlorsäure. Die Einstellung der Säure mit wasserfreier Soda, gelöst in Eisessig, ist bei Verwendung einer Kupferacetat-Eisessiglösung als Bezugselektrodenfüllung möglich.

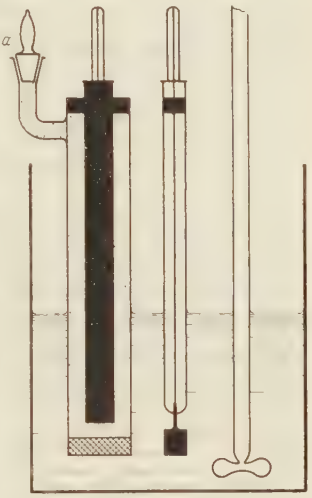


Abb. 1. Elektrodenanordnung für gewisse Titrationen in nichtwäßrigen Medien.

Für eine Potentialbildung und Ableitung in der Kupferacetat-Eisessiglösung eignet sich ein Kohlestab aus einer Taschenlampenbatterie sehr gut.

Der allgemeine Aufbau der Elektrode ist aus Abb. 1 zu erkennen. Die erste Elektrodenfüllung mit Kupferacetat-Eisessiglösung erfolgt zweckmäßig durch Ansaugen bei *a*. Auf eine Ausfüllung des gesamten Innenraumes mit Lösung ist zu achten.

Zusammenfassung.

Mit einer Goldelektrode als Indicatorelektrode sowie der beschriebenen Bezugselektrode wurde der Gehalt von technisch hergestellten sekundären und tertiären aliphatischen Aminen und deren Gemischen in Acetonitril, Alkoholen, Eisessig und Essigsäureanhydrid durch potentiometrische Titration bestimmt.

Herrn Chem.-Ing. F. Oehme sei für wertvolle Hinweise und Anregungen bei dieser Arbeit besonders gedankt.

Literatur.

[1] Glöckner, G.: Chem. Techn. **5**, 634 (1953). — [2] Glöckner, G.: Vortr. z. Chemiedoz.-Tagung d. chem. Ges. am 20. u. 21. 5. 54 in Dresden. — [3] Houben-Weyl, Methoden der org. Chemie, Bd. II (Analytische Methoden). Stuttgart 1954. — [4] Jander, G., u. H. Klaus: Z. Elektrochem. **58**, 237 (1954). — [5] Larson, W., and F. MacDouall: J. phys. Chemistry **41**, 493 (1937). — [6] Müller, E.: Elektrometrische Maßanalyse, 7. Aufl. Dresden und Leipzig 1944.

Hans Zeidler, Jena, Beuthenbergstraße 11.

Aus der Anorganisch-analytischen Abteilung des Chemischen Instituts der Universität Mainz.

Die Bestimmung kleiner Mengen Mangandioxyd.

Von

W. Geilmann und K. Beyermann.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. März 1955.)

Bei der Untersuchung von Verwitterungskrusten auf alten Gläsern[3] ergab sich die Notwendigkeit einer genauen Bestimmung von MnO_2 neben MnO, Fe_2O_3, $CaCO_3$ und Silicaten. Erfolg versprach ein Mikroverfahren, nach dem sowohl höhere Gehalte in geringen Einwaagen als auch sehr geringe Gehalte in größeren Einwaagen erfaßt werden konnten.

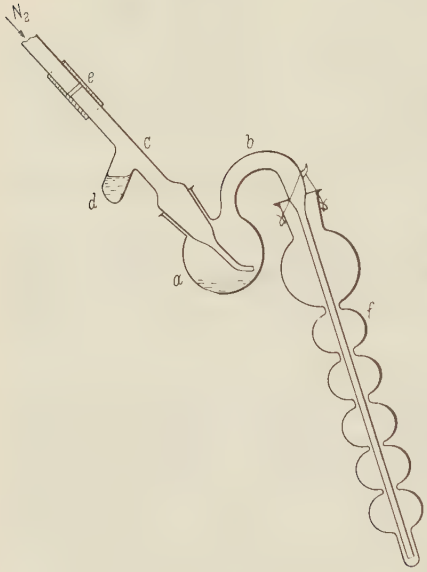


Abb. 1. Zersetzungsvorrichtung.

Die üblichen Methoden der MnO_2-Bestimmung[1] im Mikromaßstab zu verwenden, war nicht angängig. Entweder war die lösende Wirkung der erforderlichen verdünnten Lösungen zu gering oder die Rücktitration der benutzten Reduktionsmittel führte, selbst bei der Arbeit unter Luftabschluß, zu untragbaren Schwankungen.

Dagegen ließ sich das klassische Verfahren von R. Bunsen[2] durch Verwendung eines zweckmäßigen Zersetzungs- und Absorptionsgefäßes zu einem recht brauchbaren Mikroverfahren gestalten.

Nach zahlreichen Versuchen erwies sich die in Abb. 1 gezeichnete Vorrichtung für die Durchführung der Zersetzung des Minerales und die Absorption des gebildeten Chlors als besonders geeignet.

Die Zersetzung der Probe erfolgt im Kölbchen *a* von 8—10 ml Inhalt, an das das Ableitungsrohr *b* für das entwickelte Chlor angeschmolzen ist. Das anfangs schräg aufsteigende Rohr ist dicht unter dem Halse angesetzt und geht in ein engeres Rohr über, das abgebogen und in die Vorlage *f* geführt wird.

In den Schliff des Kölbchens ist das Gaseinleitungsrohr *c* eingesetzt, dessen Schliff mit einem Tropfen Phosphorsäure (D 1,7) geschmiert wird. Es geht in seinem unteren Teil in eine leicht nach oben gebogene Spitze über. Dicht über dem Schliff ist, nach unten zu gerichtet, der Ansatz *d* anzuschmelzen, der zur Aufnahme der Zersetzungssäure dient und etwa 1,5 ml fassen kann. Bei *e* ist das Rohr durch Gummischlauch an das Zuführungsrohr für Stickstoff oder Kohlendioxyd angeschlossen.

Das Gas kann ohne besondere Reinigung verwandt werden, es strömt nur durch eine Waschflasche mit konzentrierter Schwefelsäure als Blasenzähler.

Die Absorptionsflüssigkeit, eine 1%ige Lösung von Kaliumjodid, befindet sich im Fünfkugelrohr *f*, in das, bei nahezu senkrechter Stellung, bis zum Boden das Ableitungsrohr *b* des Zersetzungskölbchens geführt ist.

Für die Wirksamkeit der Vorlage ist das Verhältnis der äußeren Weite des Einleitungsrohres *b* zum inneren Durchmesser des zylindrischen Teiles der Vorlage von größter Bedeutung. Ist der Abstand zwischen beiden zu klein, so steigt die gesamte Flüssigkeit beim Durchleiten des Gases in die oberste Kugel und die Absorptionswirkung ist gering, ist umgekehrt der Abstand zu groß, so bleibt die Flüssigkeit in den unteren Kugeln und die Absorptionswirkung läßt ebenfalls zu wünschen übrig. Die beste Absorptionswirkung wird erreicht, wenn der Rohrzwischenraum so gewählt ist, daß bei eingestelltem Gasstrom alle 5 Kugeln jeweils zur Hälfte gefüllt sind und bleiben. Bei einer Strömungsgeschwindigkeit des Treibgases von 2 Blasen je Sekunde, gezählt in der Waschflasche, soll der Unterschied in den Rohrweiten etwa 2 mm ausmachen. Durch Regulierung des Gasstromes ist das jeweils günstigste Absorptionsverhältnis in der Vorlage zu erreichen, das sich in diesem Fall dadurch ausprägt, daß in den oberen Kugeln keine Braunfärbung durch ausgeschiedenes Jod auftritt.

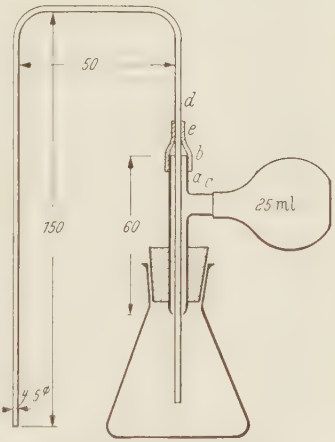


Abb. 2. Saugvorrichtung.

Zur Titration wird der Inhalt der Vorlage in das Titrationsgefäß übergeführt, wozu die in Abb. 2 dargestellte Saugvorrichtung dient, die ohne besondere Schwierigkeit mit den üblichen Laboratoriumsmitteln zu bauen ist.

Das eigentliche Titriergefäß, ein weithalsiger Erlenmeyerkolben von 75—100 ml Inhalt, ist durch einen zentral durchbohrten Gummistopfen

verschließbar. Durch die Bohrung führt ein T-Stück *a* von 6—7 mm lichter Weite, das einseitig in ein dünnes Rohr *b* ausläuft. Am seitlichen Ansatz *c* befindet sich ein Gummiball von etwa 25 ml Inhalt. Durch das gerade Schenkelstück geht das zweimal rechtwinklig gebogene Heberrohr *d*, dessen äußerer Durchmesser dem des Ableitungsrohres *b* am Zersetzungskolben entspricht und das durch ein Stückchen übergezogenen Gummischlauch bei *e* im weiteren Rohr gehalten wird.

Nach dem Zusammensetzen drückt man den Gummiball zusammen, führt den längeren Schenkel des Heberrohres bis zum Boden der Fünfkugelvorlage und saugt durch langsames Nachlassen des Druckes auf den Ball ihren Inhalt in das Titriergefäß, wobei die von oben nachfließende Lösung bereits den unteren Teil der Vorlage auswäscht.

Durch zweimaliges Ausspülen mit jeweils 5 ml Wasser, das in gleicher Weise abgesaugt wird, wird die Vorlage ausgewaschen. Merkliche Jodverluste sind bei vorsichtigem Absaugen und nicht zu großem Abstand der Mündung des Heberrohres vom Boden des Auffanggefäßes nicht zu befürchten.

Der Gedanke, sie dadurch auszuschließen, daß die Lösung aus der Vorlage in eine, ins Absaugegefäß gebrachte Thiosulfatlösung eingesaugt wird, deren Überschuß durch Rücktitration mit Jodlösung ermittelt wird, ist grundsätzlich durchführbar. Die auftretende Säurekonzentration bewirkt keine Änderung des Thiosulfattiters, selbst wenn die Rücktitration erst 1 Std nach der Mischung erfolgen sollte, wie durch entsprechende Versuche festgestellt werden konnte. Ein besonderer Vorteil bietet sich jedoch nicht, insbesondere, da die Möglichkeit eines weiteren Meßfehlers in das ganze Arbeitsverfahren gelangen würde.

Die Anbringung eines Hahnes am unteren Ende der Absorptionsvorlage, durch den der Inhalt einfach in das Titriergefäß auslaufen könnte und damit das geschilderte Absaugen überflüssig wird, ist durchaus möglich, jedoch ist zu bedenken, daß die in der unteren Kugel recht konzentrierte Jodlösung Gelegenheit zur Einwirkung auf den Schliff und sein Schmiermittel findet und Verluste eintreten können, die stärker ins Gewicht fallen, als wenn der Inhalt in der beschriebenen Weise in das Titriergefäß übergeführt wird.

Die Titration der Lösung, die etwa 20—25 ml betragen wird, erfolgt in der üblichen Weise aus einer in 0,01 ml geteilten, nachgeprüften Mikrobürette mit einer 0,005 n Thiosulfatlösung, die kurz vorher gegen Kaliumjodat eingestellt war, unter Innehaltung der bekannten, aber notwendigen Vorsichtsmaßnahmen[4].

Die Erkennung des Endpunktes der Titration kann in üblicher Weise mit Stärke erfolgen, wobei jedoch eine Neigung zu Unterwerten zu beobachten ist, sobald schneller auf farblos titriert und das Lösungsvolumen und damit die KJ-Konzentration, nicht peinlich konstant gehalten werden.

Wesentlich bessere und übereinstimmende Werte ergeben sich bei der elektrometrischen Indicierung des Endpunktes, wobei ein blankes Platinblech von 0,4 cm^2 Oberfläche gegen eine gesättigte Kaliumchlorid-Kalomelelektrode geschaltet und die Spannung mit einem „Pehavi" der Firma Hartmann und Braun gemessen wurde. Bei dieser Anordnung ergab sich beim Endpunkt ein Potentialsprung von rund 50 mV.

Eine mechanische Rührung ist nicht unbedingt erforderlich, es genügt ein leichtes Schwenken des Kolbens, wenn bis zur jeweiligen Einstellung des Potentiales 25—30 sec gewartet wird.

Wie aus den Zahlen der Tab. 1 hervorgeht, wird die bei Verwendung von Stärke durch Volumänderung und damit Änderung der KJ-Konzentration auftretende Schwankung des Endpunktes bei elektrometrischer Indicierung weitestgehend beseitigt.

Tabelle 1. *Abhängigkeit des Endpunktes der Titration von der KJ-Konzentration.* Verbrauch an 0,01 n $Na_2S_2O_3$-Lösung in ml.

H_2O-Zusatz ml	0,5% KJ		1% KJ		10% KJ	
	Stärke ml	Elektrom. ml	Stärke ml	Elektrom. ml	Stärke ml	Elektrom. ml
0,0	2,39	2,41	2,42	2,42	2,46	2,45
10	2,39	2,41	2,41	2,43	2,44	2,43
20	2,37	2,42	2,38	2,42	2,43	2,44
30	2,34	2,42	2,36	2,43	2,42	2,42
40	2,30	2,42	2,30	2,42	2,42	2,42

Es wurden jeweils 10 ml 0,5, 1,0 oder 10%ige Kaliumjodidlösung mit steigenden Wassermengen versetzt und titriert, nachdem vorher durch Zugabe von 3 ml eingestellter Kaliumjodatlösung und 0,5 ml konz. Salzsäure eine definierte Jodmenge in Freiheit gesetzt war. Die bei verdünnten KJ-Lösungen beobachteten Unterschiede beider Endpunktsbestimmungen verschwinden, sobald die KJ-Konzentration durch Zugabe einer entsprechenden Menge an festem Kaliumjodid auf 1—2% erhöht wird.

Der in der konzentrierteren KJ-Lösung bei beiden Titrationsverfahren beobachtete Mehrverbrauch ist zweifellos auf eine Luftoxydation zurückzuführen, denn aus 10 ml 10%iger Kaliumjodidlösung wurde auf Zusatz von 0,5 ml konz. Salzsäure eine Jodmenge freigemacht, die 0,03—0,05 ml $Na_2S_2O_3$-Lösung entsprach, während unter gleichen Bedingungen bei einer 0,5—1%igen KJ-Lösung kein Verbrauch auftrat.

Ausführung der Bestimmung.

Die Probe wird mittels Wägeröhrchen in den trockenen Zersetzungskolben gegeben und ihre Menge durch Differenzwägung auf der Mikro- bzw. Halbmikrowaage ermittelt.

Nach dem Durchfeuchten mit 1 Tropfen Wasser (0,05—1 ml) wird der Stopfen *c* aufgesetzt, in dessen Aufsatz *d* von *e* aus mittels Hakenpipette 1 ml Salzsäure (D 1,18) gebracht und dessen Schliff mit 1 Tropfen Phosphorsäure befeuchtet war.

Nach dem Anschluß an das Treibgas, das zur Vertreibung von Luft aus Waschflasche und Leitung bereits einige Zeit angestellt war, wird der erprobte Gasstrom durch Beobachtung der Blasenfolge in der Waschflasche eingestellt.

Die mit 10 ml 1,0%iger KJ-Lösung beschickte Vorlage wird bei laufendem Treibgas angesetzt, um ein Eindringen von KJ-Lösung in das Ableitungsrohr *b* des Kölbchens auszuschließen.

Nach etwa 2 min ist die Luft aus dem Kölbchen genügend vollständig vertrieben.

Nun wird der Stopfen *c* um 180° gedreht, so daß die Säure aus *d* ausfließt und durch die Spitze, die jetzt nach unten weist, zur Probe gelangt.

Der Inhalt des Kölbchens, das auf einem Asbestdrahtnetz steht, wird durch die Sparflamme eines Bunsenbrenners zum leichten Sieden solange erhitzt, bis etwa die Hälfte der Flüssigkeit übergetrieben ist, was in 5—8 min der Fall sein wird. Das Sieden darf nicht bis zum Stoßen der Lösung führen, da dann ein Überspritzen der meist stark eisenhaltigen Lösung zu fehlerhaften, zu hoch liegenden Ergebnissen führen könnte.

Man senkt die Vorlage bei laufendem Gasstrom, spült das Ableitungsrohr mit wenigen ml Wasser ab und unterbricht den Gasstrom erst dann, sobald das Rohr völlig aus der Vorlage gezogen ist.

Der Inhalt der Vorlage wird in der geschilderten Weise in das Titriergefäß übergeführt und das frei gewordene Jod sofort mit der kurz vorher eingestellten bzw. überprüften etwa 0,005 n $Na_2S_2O_3$-Lösung aus einer in 0,01 ml geteilten Bürette titriert.

Die bei der Untersuchung an sorgfältigst verriebenen Gemischen von Braunstein mit Sand und an feinstem Naturbraunstein erhaltenen Ergebnisse sind in den Tab. 2 und 3 aufgeführt. Die angegebenen Sollwerte waren in größeren Einwaagen in üblicher Weise nach der Eisen(II)-sulfatmethode ermittelt und von verschiedener Seite mehrfach überprüft. Außer diesen sind die verwandten Einwaagen der nach der vorgeschlagenen Methode gefundenen prozentischen MnO_2-Gehalte, die Abweichungen im prozentischen Gehalt sowie die diesem entsprechende MnO_2-Menge in μg aufgeführt.

Tab. 2 enthält die bei der elektrometrischen Indicierung des Endpunktes der Thiosulfattitration gefundenen Werte. Sie zeigen ziemlich gleichmäßig positive und negative Abweichungen, ein Zeichen, daß grundsätzliche Fehler nicht vorhanden zu sein scheinen. Wie ein Blick auf die Abweichungen in μg lehrt, können sie allein schon durch die Ablesefehler bei der Titration erklärt werden. Eine grundsätzliche Neigung zu Unterwerten, die infolge unzweckmäßiger Arbeitstechnik der Methode von R. Bunsen nachgesagt wird, tritt keinesfalls hervor. Die Übereinstimmung der gefundenen Werte sowohl untereinander als auch mit den mikrochemisch gefundenen Zahlen dürfte auch für anspruchsvollere Analysen ausreichend sein.

Bei unmittelbarer Titration der durch das Ausspülen der Vorlage verdünnten Absorptionsflüssigkeit treten grundsätzlich Minuswerte auf, allein bedingt durch die Eigenart der Stärke als Indicator.

Tabelle 2.

Leistungsfähigkeit der MnO_2-Bestimmung. Elektrometrische Indicierung.

Einwaage	%-Gehalt		Abweichung		Einwaage	%-Gehalt		Abweichung	
in mg	Soll	gef.	%	µg	in mg	Soll	gef.	%	µg
24,50	1,59	1,69	+ 0,10	+ 26	18,30	0,72	0,73	+ 0,01	+ 2
22,39	1,59	1,63	+ 0,04	+ 9	6,52	0,72	0,79	+ 0,07	+ 5
19,85	1,59	1,56	— 0,03	— 6	2,532	26,22	26,28	+ 0,06	+ 4
15,40	1,59	1,53	— 0,06	— 9	1,142	26,22	26,62	+ 0,40	+ 5
15,46	1,59	1,60	+ 0,01	+ 2	3,640	63,91	64,29	+ 0,38	+ 14
14,84	1,59	1,59	± 0,00	± 0	2,511	63,91	64,45	+ 0,54	+ 14
13,00	1,59	1,61	+ 0,02	+ 3	3,006	69,68	70,00	+ 0,32	+ 9
11,56	1,59	1,61	+ 0,02	+ 3	2,588	69,68	69,98	+ 0,30	+ 8
10,34	1,59	1,57	— 0,02	— 2	2,665	88,77	88,69	— 0,08	— 6
1,107	1,59	1,64	+ 0,05	+ 0,6	3,710	88,77	88,74	— 0,03	— 3
0,742	1,59	1,58	— 0,01	— 0,1	4,667	85,93	86,20	+ 0,27	+ 13
0,717	1,59	1,43	— 0,16	— 1,1	4,205	85,93	86,05	+ 0,12	+ 5
0,641	1,59	1,45	— 0,14	— 1,7	3,643	88,06	88,09	+ 0,03	+ 1

Wird den Lösungen unmittelbar vor der Titration festes Kaliumjodid bis zur Konzentration von 1—2% zugesetzt, so werden etwa 0,1 ml 0,005 n $Na_2S_2O_3$-Lösung mehr verbraucht und die Werte erhöhen sich für den MnO_2-Gehalt um etwa 20 µg, so daß damit die Übereinstimmung mit den bei elektrometrischer Indicierung gefundenen Werten innerhalb der Fehlergrenze erreicht wird.

Dies zeigt zur Genüge die Tab. 3, in der nebeneinandergestellt sind die bei der unmittelbaren Titration gefundenen und die bei Zusatz der hinreichenden Menge an Kaliumjodid gefundenen Werte.

Tabelle 3. *MnO_2-Bestimmung bei Verwendung von Stärke als Indicator.*

Einwaage	Unmittelbar titriert				Nach KJ-Zusatz titriert				
	MnO_2 %		Abweichung		Einwaage	MnO_2 %		Abweichung	
mg	Soll	gef.	in %	in µg	mg	Soll	gef.	in %	in µg
58,8	0,724	0,65	— 0,07	— 40	63,1	0,563	0,556	— 0,007	— 6
48,7	0,724	0,66	— 0,06	— 32	46,5	0,563	0,598	+ 0,035	+ 13
27,1	0,724	0,59	— 0,13	— 36	33,1	0,563	0,569	+ 0,006	+ 2
14,1	0,724	0,37	— 0,35	— 50	32,9	0,563	0,564	+ 0,001	+ 1
14,0	0,724	0,42	— 0,30	— 37	25,9	0,563	0,564	+ 0,001	+ 1
8,80	0,724	0,37	— 0,35	— 31	23,4	0,563	0,540	— 0,023	— 5

Das vorgeschlagene Verfahren ist in gleicher Weise zur Bestimmung anderer Dioxyde geeignet, wie Versuche mit PbO_2 zeigten, bei denen gleich gute und übereinstimmende Werte erhalten wurden.

Zusammenfassung.

Das klassische Verfahren von R. Bunsen zur Bestimmung von Mangandioxyd ist auch für die Bestimmung geringer MnO_2-Gehalte und für Mikroanalysen anwendbar. Die Titration des gebildeten Jods mit Natriumthiosulfatlösung erfolgt am besten elektrometrisch, da hier die für den Umschlag der Stärke bekannten Unsicherheiten fortfallen, die aber durch Zusatz von KJ vor der Titration wesentlich beschränkt werden können. Die Genauigkeit der Bestimmung ist durchaus zufriedenstellend.

Literatur.

[1] Vergleiche hierzu H. und W. Biltz: Ausführung quantitativer Analysen, S. 219, 5. Auflage 1947. — [2] Bunsen, R.: Liebigs Ann. Chem. **86**, 265 (1853). — Blanc, M. L., und E. Eberius: diese Z. **89**, 81 (1932). — [3] Geilmann, W., und K. Beyermann: Erscheint später in: Glastechnische Berichte. — [4] Lungdahl, M.: Biochem. Z. **96**, 325 (1919).

Prof. Dr. W. Geilmann, Mainz, Saarstraße 21.

Aus dem Untersuchungslaboratorium der Chemischen Werke Hüls, Marl i. Westf.

Die Bestimmung von Glyoxal und Glyoxylsäure.

Von

Franz Salzer.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. März 1955.)

Technische Glyoxallösungen enthalten je nach Herstellungsverfahren noch Säuren, wie z. B. Essigsäure, Glyoxylsäure und Oxalsäure. Der Glyoxalgehalt wird in derartigen Lösungen bisher durch Oximierung mit neutraler Hydroxylaminchlorhydratlösung und anschließende Titration der freigewordenen Salzsäure bestimmt, wobei Bromphenolblau oder Methylorange als Indicatoren angewandt werden. Diese Methode hat bei technischen Glyoxallösungen den Nachteil, daß der Farbumschlag sehr unscharf ist. Auch unter Zuhilfenahme von Farbvergleichen erreicht man keine große Analysengenauigkeit. Hierzu kommt noch, daß dabei Glyoxylsäure mit als Glyoxal erfaßt wird. Die Ungenauigkeit dieser Bestimmungsmethode wird verständlich, wenn man bedenkt, daß bei technischen Glyoxallösungen erst die darin enthaltenen Säuren neutralisiert werden müssen. Da es sich vorwiegend um organische Säuren handelt, ergeben diese bei der Neutralisation schwach basische Salze. Hydroxylaminchlorhydrat ist dagegen das Salz einer schwachen Base und einer starken Säure. Nach der Neutralisation der schwachen Säuren

mit Natronlauge und der Zugabe von Hydroxylaminchlorhydrat zur Oximierung liegt deshalb ein stark gepuffertes System vor, bei dessen Titration mit Lauge nur ein allmählicher Farbumschlag zu beobachten

Abb. 1. Potentiometrische CO_2-Bestimmung durch Oximierung in saurem Glyoxal. *a* Titration der Säuren im Glyoxal. *b* Titration der angesäuerten Hydroxylaminchlorhydratlösung. *c* Titration der bei der Oximierung abgespaltenen Salzsäure.

ist. Noch deutlicher werden diese Verhältnisse, wenn man obige Titrationen potentiometrisch mit der Glaselektrode durchführt. Neutralisiert man zunächst die saure Glyoxallösung mit Natronlauge, so erhält man einen großen Potentialsprung mit einem Umschlagspotential bei etwa +50 mV (Abb. 1 Kurve *a*). Bei der Titration einer mit Salzsäure angesäuerten Hydroxylaminchlorhydratlösung mit Natronlauge ist ein kleinerer, jedoch ebenfalls deutlich sichtbarer Potentialsprung zu beobachten, dessen Umschlagspotential bei etwa −250 mV liegt (Abb. 1 Kurve *b*). Titriert man in einer neutralisierten Glyoxallösung nach Zugabe von Hydroxylaminchlorhydrat die bei der Oximierung frei gewordene Salzsäure mit Lauge, so erhält man dagegen keinen deutlich sichtbaren Potentialsprung, sondern eine fast gleichmäßige Änderung im Umschlagsbereich. Das Umschlagspotential läßt sich graphisch in etwa ermitteln. Es beträgt −220 mV (siehe Abb. 1 Kurve *c*).

Diese Untersuchungen lassen erkennen, daß sowohl die Titration mit Farbindicatoren als auch die potentiometrische Gehaltsbestimmung zu ungenauen Werten führen müssen, daß also die Gehaltsbestimmung in derartigen Lösungen durch Oximierung und Titration der freigewordenen Salzsäure nicht zuverlässig genug ist. Dies gilt auch dann, wenn man auf das vorher bestimmte Umschlagspotential des Hydroxylaminchlorhydrats titriert. In der gepufferten Lösung verschiebt sich dieses nämlich um etwa 30 mV. Da die Potentialänderung im Umschlagsgebiet sehr klein ist, führt diese Methode ebenfalls zu ungenauen Werten.

Carbonylverbindungen lassen sich im allgemeinen als Dinitrophenylhydrazone gewichtsanalytisch bestimmen. Dies setzt natürlich voraus, daß die betreffenden Dinitrophenylhydrazone in Wasser unlöslich sind. Wie Löslichkeitsversuche gezeigt haben, ist diese Voraussetzung beim Glyoxylsäuredinitrophenylhydrazon nicht erfüllt. Dessen Löslichkeit beträgt bei 22° C nach inzwischen durchgeführten Untersuchungen 44 mg/100 ml wäßriger Lösung. In saurer Lösung ist die Löslichkeit noch größer. So lösen sich in 30%iger Perchlorsäure 150 mg 100 ml. Da zur Lösung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons größere Mengen starker Säuren, z. B. Perchlorsäure, erforderlich sind, ist die Löslichkeit des Dinitrophenylhydrazons für eine quantitative Bestimmung zu groß.

Nach A. Darapsky u. M. Prabhakar[2] läßt sich Glyoxylsäure mit konz. Semicarbazidchlorhydratlösung vollständig fällen. Wie jedoch Löslichkeitsversuche gezeigt haben, ist die Löslichkeit des Glyoxylsäuresemicarbazons und auch die des Glyoxalsemicarbazons für eine quantitative Bestimmung dieser Komponenten zu groß. Die Löslichkeit beträgt für das Semicarbazon der Glyoxylsäure bei 20°C 45 mg 100 ml Lösung, für das des Glyoxals 14,2 mg/100 ml.

A. Die titrimetrische Bestimmung der Carbonylverbindungen — Glyoxal + Glyoxylsäure — über die Semicarbazone.

Nach G. S. Smith[5] läßt sich Semicarbazid titrimetrisch folgendermaßen bestimmen:

Eine Einwaage von 0,08 g Semicarbazidchlorhydrat verdünnt man mit 500 ml dest. Wasser, gibt dann 20 ml 5 n Schwefelsäure und anschließend 50 ml 0,1 n Kaliumjodatlösung zu. Die Mischung läßt man 3 min verschlossen stehen, setzt Kaliumjodid im Überschuß zu und titriert anschließend das gesamte ausgeschiedene Jod mit 0,1 n Natriumthiosulfatlösung.

Dabei spielen sich folgende Reaktionen ab:

1.: $5\,NH_2—NH—CO—NH_2 + 4\,HJO_3 = 5\,N_2 + 5\,NH_3 + 5\,CO_2 + 7\,H_2O + 4\,J$ (1)

2.: $HJO_3 + 5\,HJ = 6\,J + 3\,H_2O$ (1)

Bei Reaktion (1) entstehen aus 4 KJO_3 4 Äquivalente Jod, bei Reaktion (2) aus derselben KJO_3-Menge (4 KJO_3) dagegen 24 Äquivalente Jod. Ist kein Semicarbazid vorhanden, so findet nur Reaktion (2) statt (Blindwerttitration). In

Gegenwart von Semicarbazid läuft vor der Kaliumjodidzugabe Reaktion (1) ab und erst nach Zugabe von Kaliumjodid wird das restliche Kaliumjodat nach Reaktion (2) umgesetzt (Hauptwerttitration). Die Differenz im Thiosulfatverbrauch zwischen Blindwert- und Hauptwerttitration ist demnach ein Maß für den Semicarbacidgehalt:

$$5\ NH_2—NH—CO—NH_2 \rightarrow (24—4)\ \text{Äquiv. J} \rightarrow 20\ \text{Äquiv. J}$$

Es entsprechen also:

1 Äquiv. Jod = 0,25 Mol Semicarbazid;

1 ml 0,1 n $Na_2S_2O_3$-Lösung ≙ 1,877 mg Semicarbazid.

Verwendet man für die Fällung der Semicarbazone von Glyoxal und Glyoxylsäure einen bekannten Überschuß an Semicarbazid, so muß sich der Gehalt an Carbonylgruppen aus der Bestimmung des nicht umgesetzten Semicarbazids titrimetrisch erfassen lassen. Voraussetzung ist dabei, daß

1. die Semicarbazonbildung vollständig verläuft,

2. das Semicarbazon von dem zugesetzten Kaliumjodat bzw. der Jodsäure nicht angegriffen wird.

Wie im Versuchsteil C 2 (S. 265) gezeigt wird, sind diese Voraussetzungen unter geeigneten Versuchsbedingungen erfüllt. Es ist also möglich, über die titrimetrische Bestimmung des Semicarbazidverbrauches die Summe Glyoxal + Glyoxylsäure als Carbonylzahl* zu erfassen.

B. Die Bestimmung des Glyoxals neben Glyoxylsäure.

Ziel unserer Untersuchungen war, nicht nur eine hinreichend genaue Bestimmung für die Summe Glyoxal + Glyoxylsäure zu erhalten, sondern auch eine dieser Komponenten allein bestimmen zu können, um so die Gehalte beider Komponenten einzeln zu ermitteln. Dies ist beim Glyoxal möglich, da sich dieses unter Einfluß von Alkali in Glykolsäure umsetzt (Cannizzaro-Reaktion), die ihrerseits Alkali bindet. Setzt man Glyoxal einen bekannten Laugeüberschuß zu, so entsteht unter Laugeverbrauch glykolsaures Natrium. Der Laugeverbrauch läßt sich titrimetrisch erfassen.

$$\begin{matrix} CHO \\ | \\ CHO \end{matrix} + NaOH = \begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ COONa \end{matrix}$$

Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Reaktion ist, daß

1. die Cannizzaro-Reaktion genügend rasch und vollständig verläuft,

2. die neben Glyoxal vorhandene Glyoxylsäure nicht angegriffen wird.

Wie unter C 3 (S. 268) gezeigt wird, lassen sich diese Forderungen erfüllen.

* Die Carbonylzahl (COZ) entspricht der Menge KOH in mg/g Substanz, die der zur Semicarbazonbildung erforderlichen Menge Semicarbazidchlorhydrat äquivalent ist.

Mit Hilfe beider Methoden, der titrimetrischen Bestimmung der Summe Glyoxal + Glyoxylsäure über die Semicarbazone einerseits und der Bestimmung des Glyoxals über die Cannizzaro-Reaktion andererseits, lassen sich beide Komponenten getrennt erfassen.

C. Versuchsteil.

1. Herstellung einer als Testsubstanz geeigneten Glyoxylsäure aus technischen Lösungen.

Für die Durchführung der Untersuchungen war die Herstellung reiner Testsubstanzen erforderlich. Da Glyoxal in reiner Form nicht herzustellen ist, beschränkten wir uns auf die Gewinnung von Glyoxylsäure. Die Verwendung von Glyoxylsäure als Testsubstanz erschien ohnehin zweckmäßiger, da deren Semicarbazon eine größere Löslichkeit als das Semicarbazon des Glyoxals besitzt und deshalb bei der Bestimmung eher Schwierigkeiten zu erwarten waren.

A. Darapsky u. M. Prabhakar[2] stellten Glyoxylsäure durch elektrolytische Reduktion von Oxalsäure her. Die Glyoxylsäure wurde über das Calciumsalz isoliert und aus diesem mit Oxalsäure in Freiheit gesetzt.

Wir gingen von einer technischen Glyoxylsäure aus, die 26,5 Gew.% Glyoxylsäure, 1,7% Glyoxal und 0,72% Oxalsäure neben anderen Verunreinigungen enthielt.

1 kg dieser Lösung wurde mit 300 ml Wasser verdünnt und mit etwas mehr als der berechneten Menge Calciumcarbonat (270 g) versetzt. Nach 3stündigem Rühren wurde abgesaugt und der Filterrückstand auf der Nutsche mit 200 ml Eiswasser gewaschen. Der gewaschene Rückstand wurde dreimal mit je 10 Liter heißem Wasser extrahiert. — 1 Tl. glyoxylsaures Calcium löst sich bei 100° C in 40 Tln., bei 8° C in 177 Tln. Wasser. — Zu dem Extrakt wurde dasselbe Volumen Äthylalkohol zugesetzt, damit das glyoxylsaure Calcium ausgefällt und anschließend im Vakuum getrocknet. Es fielen insgesamt 361 g kristallwasserhaltiges Calciumsalz $(CHO \cdot COO)_2Ca \cdot 2\ H_2O$ mit einem Ca-Gehalt von 17,73% an.

310 g des glyoxylsauren Calciums wurden mit 3 Liter Wasser aufgeschlämmt und mit der berechneten Menge Oxalsäure — 172,8 g $H_2C_2O_4 \cdot 2\ H_2O$ — 48 Std verrührt. Das ausgefällte Calciumoxalat wurde durch Filtration abgetrennt und die klare wäßrige Glyoxylsäurelösung im Vakuum bei 35° C eingeengt, nochmals filtriert und nach weiterem Eindampfen schließlich im Vakuumexsiccator über P_2O_5 getrocknet. Es wurden 187 g kristallisiertes Produkt mit 10,63% Wasser gewonnen.

Da die Glyoxylsäure äußerst hygroskopisch ist, wurde für die weitere Analyse des Produktes eine wäßrige Lösung mit bekannten Wasserzusätzen hergestellt und diese analysiert. Lediglich die Elementaranalyse und der Wassergehalt wurden in der Originalprobe bestimmt. Letzterer wurde nach K. Fischer[3] unter Zuhilfenahme der Dead stop-Methode[4] bestimmt, wobei wir als Lösungsmittel eine 5%ige Lösung von Blausäure in Dioxan anwandten, um Störungen durch die Aldehydgruppe zu vermeiden[1].

Aus der Originalsubstanz und den Lösungen mit bekanntem Wasserzusatz, umgerechnet auf die Originalsubstanz, wurden folgende Analysenwerte ermittelt:

C	29,38—29,17%
H	3,25— 3,20%
Wasser	10,60—10,63—10,66%
Säurezahl (mg KOH/g)	688,7 —688,0
Oxalsäure	2,20%
Asche	0

Glyoxylsäure

a) bestimmt nach Semicarbazidmethode: 87,44%
b) berechnet aus Säurezahl nach Abzug der Oxalsäure 87,30%

Analyse des Semicarbazons:	gefunden	theoret. u. Literaturwerte
C	27,43—27,37%	27,48%
H	3,88— 3,97%	3,84%
O	36,94—36,92%	36,62%
N	31,55—31,84%	32,06%
Säurezahl	427,5	428,0
Schmelzpunkt	203° C (Zers.)	202° C (Zers.)

Analyse des 2,4-Dinitrophenylhydrazons:	gefunden	theoret. Werte
C	37,85—37,67%	37,80%
H	2,28— 2,39%	2,38%
O	37,62—37,62%	37,77%
N	21,98—22,05%	22,05%
Säurezahl	220,0	220,7
Schmelzpunkt	196,5° C	.

Diese Glyoxylsäure entspricht dem kristallwasserhaltigen Produkt $CHO — COOH \cdot 1\frac{1}{2}\ H_2O$ (10,84% H_2O). Sie ist allerdings mit einer geringen Menge Oxalsäure verunreinigt. Es ist anzunehmen, daß bei der Umsetzung des glyoxylsauren Calciums mit Oxalsäure, letztere nicht vollständig umgesetzt wurde, weil das ausgefällte Calciumoxalat einen geringen Teil des glyoxylsauren Calciums mitgerissen hat, das so der Zersetzung durch Oxalsäure entging. Bei Verwendung dieser Glyoxylsäure als Testsubstanz für die folgenden Untersuchungen stört dieser bekannte Oxalsäuregehalt jedoch nicht. Andere Verunreinigungen, außer Wasser und Oxalsäure, dürften nach obigen Analysen nicht vorliegen.

2. Die titrimetrische Bestimmung der Carbonylzahl über die Semicarbazone.

Zur Bestimmung wurde, wie bereits in Abschnitt A (S. 262) besprochen, die Glyoxylsäure mit einem bekannten Überschuß an Semicarbazid gefällt und anschließend das nicht umgesetzte Semicarbazid nach Smith[5] titrimetrisch bestimmt.

Als Testsubstanzen wurden die nach C 1 (S. 264) hergestellten Glyoxylsäuren verwandt, die neben 87,3—88,3% Glyoxylsäure noch Kristallwasser und etwa 2% Oxalsäure enthielten. Von diesen Testsubstanzen wurden wäßrige Lösungen hergestellt. Die in den folgenden Tabellen angegebenen Einwaagen sind auf die Einwaagen an Testsubstanz umgerechnet.

Tabelle 1. *Abhängigkeit der Gehaltsbestimmung von der Semicarbazonbildungsdauer.* Zusammensetzung des Testmaterials: H_2O 10,63%; Oxalsäure 2,20%; Glyoxylsäure 87,30% (ber. aus Sz., abzügl. Oxalsäure). — Rk.-Temperatur 60° C; zugesetzt 25 ml 10%ige KJ-Lösung, 100 ml 5 n CH_3COOH, 50 ml etwa 0,2 n KJO_3-Lösung = 101,5 ml 0,1 n Lösung. KJO_3-Einw.-Dauer 2 min.

Rk.-Zeit in Stunden	Einwaage an Testmaterial in mg	Zugesetzte Menge Semicarbazid in mg	Zurücktitrierte ml 0,1 $Na_2S_2O_3$-Lösung	Verbrauchtes Semicarbazid für Semicarbazonbildung in mg	Glyoxylsäuregehalt des Testmaterials in %
1	142,0	252,0	33,58	124,8	86,75
1	142,4	253,2	33,40	125,7	87,10
2	141,6	250,2	34,42	124,7	86,95
2	142,4	251,1	34,58	125,7	87,20
4	142,0	256,0	32,10	126,0	87,50
4	142,4	255,0	32,75	126,2	87,50
20	142,4	252,0	34,38	126,2	87,40
30	142,2	252,2	34,65	126,8	87,75

a) Die Semicarbazonbildungsdauer.

Bei Raumtemperatur ist die Semicarbazonbildung erst nach 20stündiger Reaktionszeit vollständig. Erhöht man die Reaktionstemperatur dagegen auf 60° C, so verläuft die Semicarbazonbildung schneller. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist die Fällung nach 3—4 Std vollständig. Für die Bestimmung wird deshalb eine Reaktionszeit von 4 Std und eine Reaktionstemperatur von 60° C gewählt.

Tabelle 2. *Abhängigkeit der Gehaltsbestimmung vom Semicarbazidüberschuß.* Zusammensetzung des Testmaterials: H_2O (Fischer) 10,63%, Oxalsäure 2,20%, Glyoxylsäure 87,30% (ber. aus Sz., abzügl. Oxalsäure), Glyoxylsäuregehalt 87,50% (aus COZ-Best.). — Rk.-Zeit 4 Std, Rk.-Temp. 60° C; zugesetzt 25 ml 10%ige KJ-Lösung, 10 ml 5 n CH_3COOH. KJO_3-Einw.-Dauer 2 min.

Einwaage an Testmaterial in mg	Zugesetzte Menge Semicarbazid in mg	Vorgelegte Menge 0,2 n KJO_3 ausgedrückt in ml 0,1n Lösg.	Zurücktitrierte ml 0,1 n $Na_2S_2O_3$-Lösung	Verbrauchtes Semicarbazid in mg	Semicarbazidüberschuß in %	Glyoxylsäuregehalt in %
100,6	112,4	100,7	87,10	88,67	29	85,2
102,5	111,9	100,7	88,60	89,23	25	85,0
200,0	306,1	101,5	32,80	177,50	74	87,55
200,1	307,5	101,5	32,25	177,7	73	87,55
99,8	205,8	101,5	38,70	88,2	133	87,40
101,3	205,9	101,5	39,62	90,0	129	87,60
104,9	207,3	101,0	39,95	92,9	124	87,20
50,2	150,7	101,0	44,30	44,5	239	87,10
49,7	149,8	101,0	44,60	44,2	239	87,60

b) Die Abhängigkeit der Semicarbazonbildung von Semicarbazidüberschuß.

Für eine vollständige Umsetzung der Glyoxylsäure ist ein Semicarbazidüberschuß erforderlich. Wie Tab. 2 zeigt, reicht ein Überschuß von 25% nicht ganz aus. Mit größerem Semicarbazidüberschuß erreicht man einen vollständigen Umsatz. Es ist zweckmäßig, mit etwa 100% Semicarbazidüberschuß zu arbeiten.

Tabelle 3.

Abhängigkeit der Gehaltsbestimmung von der Acidität bei der Reaktion mit KJO_3. Glyoxylsäuregehalt des Testmaterials 87,5%. — Rk.-Temp. bei d. Semicarbazonbildung 60° C, Rk.-Dauer bei d. Semicarbazonbildung 4 Std; zugesetzt 50 ml 0,2 n KJO_3-Lösung, 25 ml 10%ige KJ-Lösung. Einw.-Dauer von KJO_3 2—3 min.

Zugesetzte Säure	ml Säure	Einwaage an Testmaterial in mg	Zugesetzte Menge Semicarbazid in mg	Vorgelegte Menge KJO_3, ausgedrückt in ml 0,1 n Lsg.	Verbrauchtes Semicarbazid für Semicarbazon in mg	Glyoxylsäuregehalt in %
5n Essigsäure	5	100,8	224,6	100,7	89,4	87,5
5n Essigsäure	10	142,0	256,0	101,5	126,0	87,5
5n Essigsäure	10	142,4	255,0	101,5	126,2	87,5
5n Essigsäure	20	142,4	253,2	101,5	126,0	87,4
5n H_2SO_4	10	100,1	223,7	100,7	85,9	84,6
5n H_2SO_4	10	101,1	223.9	100,7	87,1	84,9

c) Abhängigkeit der Carbonylzahlbestimmung von der Acidität bei der Titration.

Wie Tab. 3 zeigt, ist die COZ-Bestimmung von der Acidität des Titrationsansatzes abhängig. Benutzt man — wie von G. St. Smith[5] angegeben — Schwefelsäure, so findet man zu niedrige Glyoxylsäuregehalte. Offensichtlich wird das Semicarbazon in Gegenwart von Schwefelsäure teilweise in Semicarbazid und

Tabelle 4. *Abhängigkeit der Gehaltsbestimmung von der Einwirkungsdauer des KJO_3-Überschusses auf das Semicarbazon-Semicarbazidgemisch.* Glyoxylsäuregehalt des Testmaterials 88,3%. — Rk.-Temp. 60° C; zugesetzt 50 ml etwa 0,2 n KJO_3-Lösung, entspr. 100,7 ml 0,1 n Lösung, 25 ml 10%ige KJ-Lösung, 10 ml 5 n CH_3COOH. — Rk.-Zeit der Semicarbazonbildung 4 Std.

Einwirkungsdauer des KJO_3 in Minuten	Einwaage an Testmaterial in mg	Zugesetzte Menge Semicarbazid in mg	Verbrauchtes Semicarbazid in mg	Glyoxylsäuregehalt in %
1	101,1	223,1	90,30	88,10
1	100,0	224,1	89,50	88,20
2	99,4	224,0	89,00	88,35
2	101,4	223,9	90,80	88,40
3	100,2	223,9	89,50	88,10
3	99,65	224,2	89,20	88,40
5	100,6	224,7	89,0	87,30
5	99,8	225,3	88,0	86,95
10	99,6	224,8	87,2	86,35
15	100,7	225,2	86,9	85,20

Glyoxylsäure aufgespalten und ersteres bei der Bestimmung des überschüssigen Semicarbazids mitbestimmt. Nimmt man an Stelle von Schwefelsäure eine schwächer dissoziierte Säure, wie z. B. Essigsäure, so erhält man günstigere Werte (s. Tab. 3). Die Menge dieser Säure ist ohne Einfluß auf die Bestimmung.

d) Einfluß der Einwirkungsdauer des Kaliumjodats.

Setzt man nach Beendigung der Semicarbazonbildung Kaliumjodat und Essigsäure zu, so ist dessen Einwirkungsdauer von Einfluß auf die Gehaltsbestimmung (s. Tab. 4, S. 267). Bei längerer Einwirkungsdauer wird offenbar das Semicarbazon von der Jodsäure angegriffen. Die Umsetzung zwischen Semicarbazid und Jodsäure verläuft jedoch so rasch, daß dieser Einfluß bei einer Reaktionszeit von 2 min ohne Bedeutung sein dürfte.

e) Der Kaliumjodatüberschuß.

Die Höhe des Kaliumjodatüberschusses beeinflußt nach den Werten der Tab. 5 die Gehaltsbestimmung nicht.

Nach diesen Untersuchungen ist es unter Einhaltung bestimmter Untersuchungsbedingungen möglich, den Glyoxylsäuregehalt durch Umsetzung mit Semicarbazid und Titration des überschüssigen Semicarbazids zu bestimmen. In Abschnitt D 1 (S. 269) ist die Analysenmethode ausführlich beschrieben.

Tabelle 5. *Abhängigkeit der Gehaltsbestimmung vom KJO_3-Überschuß.*

Glyoxylsäure im Testmaterial 87,5%. — Rk.-Temp. bei der Semicarbazonbildung 60° C, Rk.-Dauer bei der Semicarbazonbildung 4 Std; zugesetzt 50 ml etwa 0,2 n KJO_3-Lösung = 101,5 ml 0,1 n Lösg., 25 ml 10%ige KJ-Lösung, 10 ml 5 n CH_3COOH Einw.-Dauer von KJO_3 2 min.

Einwaage an Testmaterial in mg	Zugesetzte Menge Semicarbazid in mg	Zurücktitrierte ml 0,1 n $Na_2S_2O_3$-Lösung (F. 0,998)	Jodatüberschuß in %	Verbrauchtes Semicarbazid für Semicarbazonbildung in mg	Glyoxylsäuregehalt in %
200,0	306,1	32,80	23	177,50	87,55
200,1	307,5	32,25	22	177,7	87,55
100,6	154,8	66,55	142	89,3	87,50
99,8	205,8	38,70	35	88,2	87,40

Die nach dieser Methode gefundenen Glyoxylsäuregehalte in den angewandten Testsubstanzen stimmen gut mit den aus den Säurezahlen berechneten Gehalten überein. Die Methode ist unseres Erachtens auch ohne weiteres für die Bestimmung der Carbonylgruppen im Glyoxal anwendbar, zumal dessen Semicarbazon schwerer löslich ist, als das der Glyoxylsäure. Eine direkte Prüfung ließ sich nicht durchführen, da wir kein hierfür geeignetes Testmaterial besaßen.

3. Die titrimetrische Bestimmung des Glyoxals neben Glyoxylsäure.

Die titrimetrische Bestimmung des Glyoxals mit Hilfe der Cannizzaro-Reaktion läßt sich in Lösungen, die neben Glyoxal noch Glyoxylsäure enthalten, nur dann durchführen, wenn die Glyoxylsäure durch die

vorhandene Lauge nicht angegriffen wird, bzw. die CANNIZZARO-Reaktion so rasch verläuft, daß innerhalb dieser Zeit der Einfluß des Alkalis auf die Glyoxylsäure unwesentlich ist.

Man versetzte eine Glyoxallösung, die neben 22,4% Glyoxal nur 1,1% Glyoxylsäure enthielt, mit überschüssiger n Natronlauge und titrierte nach verschiedenen Reaktionszeiten den Laugeüberschuß zurück. In Tab. 6 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Man erkennt, daß die Umsetzung des Glyoxals zu Glykolsäure sehr rasch verläuft und bereits nach 1 min beendet ist. In dieser kurzen Zeit erfolgt noch kein Angriff der Lauge auf die Glyoxylsäure. Neutralisiert man z. B. 2–5 g einer 17%igen Glyoxylsäurelösung mit Lauge und gibt dazu im Überschuß 10 ml 1 n Natronlauge, so läßt sich dieser Überschuß selbst nach 15—30 min Stehen vollständig zurücktitrieren.

Tabelle 6. *Zeitabhängigkeit der Umsetzung von Glyoxal zu Glykolsäure.*

Rk.-Zeit in Minuten	g Substanz Einwaage	Vorgelegte ml n NaOH-Lösung (F. 1,001)	Zurücktitrierte ml n NaOH-Lösung	Laugeverbrauch in ml n NaOH-Lösung (F. 1,001)	% Glyoxal
1	4,5080	29,80	12,45	17,35	22,35
5	4,6610	29,80	11,85	17,95	22,35
10	4,5810	29,80	12,10	17,70	22,40
15	4,8700	29,80	11,00	18,80	22,40
30	4,7370	29,80	11,55	18,25	22,38
60	4,7320	29,80	11,40	18,40	22,58

Es wird demnach in Anwesenheit von Glyoxylsäure kein zu hoher Glyoxalwert vorgetäuscht. Die CANNIZZARO-Reaktion ist also zur Bestimmung von Glyoxal neben Glyoxylsäure anwendbar. Durchgeführt wird diese Bestimmung nach der unter D 2 (S. 272) angegebenen Vorschrift.

Die beiden Bestimmungsmethoden:

1. die gemeinsame Bestimmung von Glyoxal + Glyoxylsäure als Carbonylzahl und

2. die Bestimmung von Glyoxal allein

ergeben die Möglichkeit, beide Komponenten in technischen Lösungen getrennt zu erfassen. Zur Prüfung wurden Modellgemische aus kristallwasserhaltiger Glyoxylsäure und einem glyoxylsäurearmen Glyoxal mit 22,5% Glyoxal und 1,50% Glyoxylsäure hergestellt und diese nach den in Abschnitt D angegebenen Vorschriften untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 7 (S. 270) zusammengestellt. Die gute Übereinstimmung der gefundenen mit den berechneten Werten läßt die Brauchbarkeit dieser Methoden erkennen.

D. Analysenvorschriften zur Bestimmung von Glyoxal + Glyoxylsäure.

1. Bestimmung der Summe Glyoxal + Glyoxylsäure als Carbonylzahl.

a) Erforderliche Geräte.

1. Reaktionskolben. Als Reaktionskolben für die Semicarbazonbildung und die anschließende Titration des überschüssigen Semicarbazids benutzt man einen

Tabelle 7. *Bestimmung des Glyoxal- und Glyoxylsäuregehaltes in Modellgemischen.*

	Zusammensetzung der Mischungen		Ges.-COZ-Bestimmung mit Semicarbazid			Glyoxalbestimmung (Cannizzaro)			Gefunden		Berechnete Werte			
	Lösung A Gew. %	Lösung B Gew. %	Einw. in g	zugesetzte Menge Semicarbazid in mg	COZ	Einw. in g.	vorgel. n NaOH-Lösung ml	COZ (Glyoxal)	Gew. % Glyoxal i. d. Mischung	Gew. % Glyoxylsäure in der Mischung	Ges.-COZ.	COZ (Glyoxal)	% Glyoxal	% Glyoxylsäure
Lösung A	100%	—	0,2305	259,8	446,1	3,4290	30,0	435,0	22,5	1,5	—	—	—	—
Glyoxal			0,2251	258,9	447,0									
					∅ 446,5									
Lösung B	—	100%	0,7366	262,0	128,9	2,543	10,0	0	—	17,01	—	—	—	—
Glyoxylsäure			0,8158	259,9	128,6					16,98				
					∅ 128,75					∅ 17,0				
Mischung 1	51,38	48,62	0,3850	258,4	292,0	5,101	30,0	226,1	11,70	8,8	291,8	223,3	11,55	9,04
			0,3668	260,0	293,1									
					∅ 292,6									
Mischung 2	74,92	25,08	0,2850	259,3	367,9	4,984	30,0	326,9	16,90	5,33	366,7	325,9	16,85	5,38
			0,3030	262,2	366,7									
					∅ 367,3									
Mischung 3	26,21	73,79	0,5034	259,8	214,5	5,101	30,0	117,9	6,10	12,65	212,0	114,0	5,90	12,93
			0,5086	259,8	213,1									
					∅ 213,8									
Mischung 4	88,30	11,70	0,2422	259,9	410,0	6,075	30,0	383,8	19,85	3,46	409,3	384,0	19,86	3,34
			0,3068	260,6	410,0									
					∅ 410,0									
Mischung 5	12,85	87,15	0,6056	258,9	172,4	5,096	30,0	59,6	3,08	14,73	169,5	55,9	2,89	15,00
					172,0									
					∅ 172,2									

Lösung A: 17,0 Gew% Glyoxylsäure. — Lösung B: 22,5 Gew% Glyoxal + 1,5 Gew% Glyoxylsäure.

birnenförmig erweiterten 300 ml-Schliffkolben (s. Abb. 2) mit einem aufsetzbaren Tropftrichter (s. Abb. 3). Der Schliff des Tropftrichters ist unten zur Erleichterung der Spülung mit dem Auslaufrohr verschmolzen.

2. *Pipette für die Abmessung der Kaliumjodatlösung.* Da die KJO_3-Lösung sehr exakt abgemessen werden muß, empfiehlt es sich, die in Abb. 4 skizzierte Pipette zu benutzen. Sie gestattet die genaue Abmessung einer konstanten KJO_3-Menge von etwa 50 ml. Die auf eine Tubusflasche aufgesetzte Bürette wird von unten her gefüllt.

b) Erforderliche Reagentien.

1. *0,5 m Semicarbazidlösung.* Man löst 27,9 g Semicarbazidchlorhydrat im 50 ml-Meßkolben in Wasser und füllt mit diesem bis zur Marke auf. Der Gehalt dieser Lösung ist nach der unter D 1 c (S. 272) beschriebenen Methode zu bestimmen. Um unabhängig von Raumtemperaturschwankungen zu sein, wird der Gehalt dieser Lösung in Milligramm Semicarbazid Gramm Lösung bestimmt und bei den einzelnen Bestimmungen die Semicarbazidlösung stets mit einer Wägepipette eingewogen. Für die Gehaltsbestimmung der Semicarbazidlösung werden etwa 3 g der Lösung eingewogen.

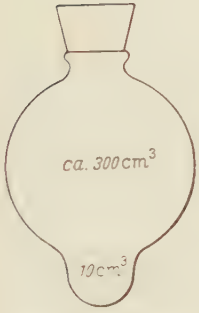


Abb. 2. Schliffkolben.

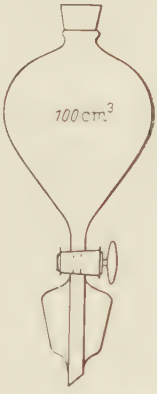


Abb. 3. Tropftrichter.

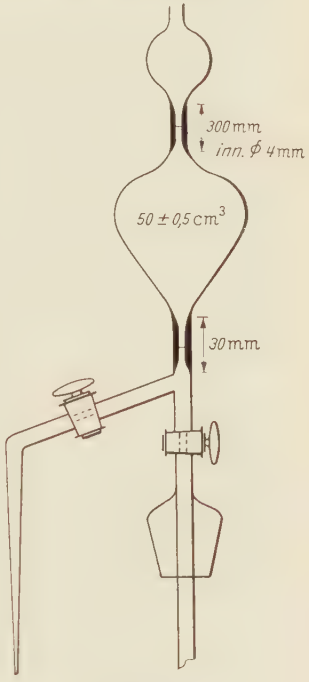


Abb. 4. Pipette zur Abmessung von KJO_3-Lösung.

2. *0,2 n Kaliumjodatlösung.* 14,268 g Kaliumjodat werden im 2 Liter-Meßkolben in dest. Wasser gelöst und mit Wasser auf 2 Liter aufgefüllt. Die Faktorstellung der KJO_3-Lösung erfolgt stets bei der Durchführung von COZ-Bestimmungen als Blindwerttitration. Hierzu wird die Pipettenfüllung (Abb. 4) in einem 300 ml-Erlenmeyer-Kolben mit 25 ml 10%iger Kaliumjodidlösung und 10 ml 0,2 n Essigsäure versetzt und anschließend das abgeschiedene Jod mit 0,1 n Natriumthiosulfatlösung titriert.

3. *5 n Essigsäure.*

4. *10%ige Kaliumjodidlösung.*

5. *0,1 n Natriumthiosulfatlösung.*

6. *10%ige Stärkelösung.*

c) Durchführung der Bestimmung.

In den birnenförmigen 300 ml-Reaktionskolben wägt man mit einer Wägepipette etwa 7 ml der Semicarbazidlösung mit bekanntem Gehalt ein. Hierzu gibt man die zu untersuchende Substanz (etwa 2 Milliäquivalente Carbonylverbindung). Man schwenkt vorsichtig um, verschließt den Kolben mit einem Schliffstopfen und läßt ihn 4 Std bei 60° C stehen. Dann kühlt man auf Raumtemperatur ab, setzt den Tropftrichter auf den Kolben auf und stellt im Reaktionskolben einen Unterdruck her, indem man über den Tropftrichter mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert.

Nun saugt man in den Reaktionskolben erst 10 ml 5 n Essigsäure, dann eine Pipettenfüllung Kaliumjodatlösung und schließlich zum Nachspülen der Jodatlösung etwas dest. Wasser ein und läßt 2 min reagieren. Bei der Jodatzugabe tritt eine beträchtliche Gasentwicklung unter gleichzeitiger Jodabscheidung ein. Da Kaliumjodid fehlt, löst sich das Jod nur teilweise. Um Jodverluste zu vermeiden, empfiehlt sich daher das Arbeiten im geschlossenen System mit Unterdruck. Nach 2 min Einwirkungsdauer saugt man durch den Tropftrichter 25 ml 10%ige Kaliumjodidlösung ein, spült den Tropftrichter sorgfältig mit dest. Wasser nach und hebt schließlich durch Öffnen des Tropftrichterhahns den Unterdruck auf. Der Tropftrichter wird abgenommen, Schliff und Ablaufrohr werden sorgfältig gespült. Das gebildete Jod wird mit 0,1 n Natriumthiosulfatlösung unter Stärkezugabe titriert.

Gleichzeitig wird der Titrationswert einer Pipettenfüllung Kaliumjodatlösung bestimmt (s. D 1, b 3).

d) Berechnung der Carbonylzahl (COZ).

Werden bei der Bestimmung der Gesamt-COZ E g der Carbonylverbindung eingewogen und dazu b g Semicarbazidlösung mit a mg Semicarbazid g Lösung zugesetzt, werden ferner bei der Blindwertbestimmung der zugesetzten Kaliumjodatlösung c ml 0,1 n $Na_2S_2O_3$-Lösung und bei der Titration im Hauptversuch d ml 0,1 n $Na_2S_2O_3$-Lösung titriert, dann gilt:

$$\text{Gesamt-COZ} = \frac{[b \cdot a - (c-d) \cdot 1{,}877] \cdot 56{,}11}{E \cdot 75{,}07}$$

$$= \frac{[b \cdot a - (c-d) \cdot 1{,}877] \cdot 0{,}7474}{E} = \text{äquiv. mg KOH/g}.$$

e) Bemerkungen.

1. *Substanzeinwaage.* Diese soll 1—2 Milliäquivalente Carbonylverbindung betragen, also 75—150 mg Glyoxylsäure bzw. 30—60 mg Glyoxal.

2. *Semicarbazidmenge.* Bei einer Einwaage von 1—2 Milliäquivalenten Carbonylverbindung wendet man 2—3 Milliäquivalente Semicarbacid an. Bei einer 0,5 m Lösung sind dies 5—7 g Semicarbazidlösung. Bei diesen Mengen beträgt der Semicarbazidüberschuß 50—150%. Der Überschuß darf jedoch in keinem Fall mehr als 2 Milliäquivalente Semicarbazid (150 mg) betragen, da sonst die zugesetzte Menge 0,2 n KJO_3-Lösung nicht ausreicht. (1 Milliäquivalent Semicarbazid verbraucht 24 ml 0,2 n KJO_3-Lösung.)

Die Einwaagen sind dann günstig gewählt, wenn bei der Titration im Hauptversuch zwischen 25 und 60 ml 0,1 n $Na_2S_2O_3$-Lösung verbraucht werden.

2. Bestimmung von Glyoxal allein.

a) Erforderliche Reagentien.

1. n Natronlauge.
2. n Schwefelsäure.

b) Durchführung der Bestimmung.

Man wägt mit einer Wägepipette etwa 0,02 Mol Glyoxal in einen 200 ml-Erlenmeyer-Kolben ein, verdünnt mit etwa 30 ml dest. Wasser, setzt einige Tropfen Phenolphthaleinlösung zu und neutralisiert je nach Säuregehalt der Probe mit 0,1 n Schwefelsäure sorgfältig, ohne überzutitrieren. Nun gibt man aus einer Bürette 30 ml n Natronlauge zu, schüttelt um und läßt 10 min bei Raumtemperatur stehen. Nach dieser Zeit titriert man den Laugenüberschuß mit n Schwefelsäure zurück.

c) Berechnung.

Werden nach exakter Neutralisation der Glyoxallösung (E g) a ml n Natronlauge zugesetzt und später b ml n Schwefelsäure zurücktitriert, dann gilt:

$$\text{COZ (f. Glyoxal allein)} = \frac{(a-b) \cdot 56{,}11 \cdot 2}{E}$$

$$\text{bzw. Glyoxalgehalt} = \frac{(a-b) \cdot 0{,}05804 \cdot 100}{E}\ \%$$

3. Berechnung des Glyoxylsäuregehaltes aus der Gesamt-COZ und dem Glyoxalgehalt.

Wird über die Semicarbazidmethode Gesamt-COZ $= A$ und über die Cannizzaro-Reaktion COZ für Glyoxal allein $= B$ bestimmt, dann gilt

$$\text{Glyoxylsäuregehalt} = \frac{(A-B) \cdot 100}{757{,}8} = \%.$$

Zusammenfassung.

Es werden Methoden beschrieben, mit deren Hilfe Glyoxal und Glyoxylsäure nebeneinander bestimmt werden können. Die Summe der Carbonylverbindungen wird mit einer bekannten Menge Semicarbazid zu den Semicarbazonen umgesetzt und das überschüssige Semicarbazid jodometrisch bestimmt. Glyoxal allein wird in einer zweiten Bestimmung mit Lauge nach Cannizzaro in glykolsaures Natrium umgesetzt und der dafür erforderliche Laugeverbrauch titrimetrisch bestimmt. Aus der Summe Glyoxal + Glyoxylsäure einerseits und der Glyoxalbestimmung andererseits läßt sich der Glyoxylsäuregehalt berechnen.

Literatur.

[1] Bryant, W. M. D., J. Mitchel jr. and D. M. J. Smith: J. Amer. chem. Soc. **62**, 350 (1940). — [2] Darapsky, A., und M. Prabhakar: Ber. dtsch. chem. Ges. **45**, 2617 (1921). — [3] Fischer, K.: Angew. Chem. **48**, 394 (1935); vgl. diese Z. **105**, 287 (1935). — [4] Foulk, C. W., and A. T. Bawden: J. Amer. chem. Soc. **48**, 245 (1926); vgl. diese Z. **86**, 260 (1931); **89**, 183 (1932). — [5] Smith, G. S.: J. chem. Soc. (London) **1937**, 1325; vgl. diese Z. **125**, 51 (1943).

Dr. F. Salzer, Chemische Werke Hüls A.-G., Marl, Kreis Recklinghausen.

Bericht über die Fortschritte der analytischen Chemie.

I. Allgemeine analytische Methoden, analytische Operationen, Apparate und Reagentien.

Gasanalyse. J. H. Förch[1] berichtet über die Ergebnisse von vergleichenden Untersuchungen, die zur *Überprüfung seiner verbesserten* Hempel-*Methode*[2] von verschiedenen Laboratorien durchgeführt wurden. Untersuchungsobjekt war eine Probe Hochofengas; die zum Vergleich herangezogenen Methoden waren die von Bunte, Orsat sowie von W. J. Gooderham[3]. Es wurden zum Teil erhebliche Differenzen in den Einzelwerten festgestellt, deren mögliche Ursachen ausführlich besprochen werden. Zwischen der verbesserten Hempel-Methode einerseits und den übrigen Methoden andererseits sind aber die Abweichungen nicht größer, als bei diesen Methoden untereinander. A. Kurtenacker.

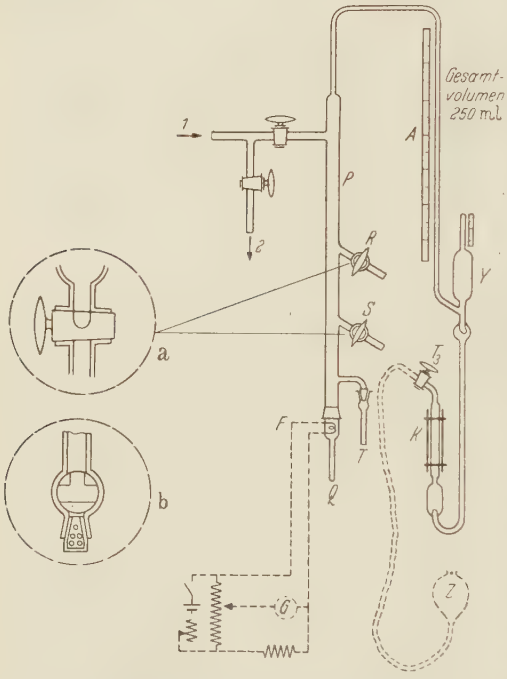


Abb. 1. Apparatur zur Mikroanalyse von Gasen nach Madley u. Strickland-Constable.

Eine Apparatur für die Mikroanalyse von Gasproben beschreiben D. G. Madley, R. F. Strickland-Constable[4] (Abb. 1). Der Apparat ist einfach herzustellen und erlaubt die ziemlich genaue Bestimmung von CO_2, CO, NO, H_2, N_2 und CH_4 in Gasproben von etwa 20 μl. Der Reaktionsraum P ist mit einem McLeod-Manometer Y verbunden sowie durch zwei kurze Seitenrohre mit den in zwei Hahnzapfen eingeschliffenen Reagentienbehältern R und S (a, b) von je 0,5 ml Inhalt. T ist ein Phosphorpentoxyd enthaltender Seitenarm, F ein 3,5 cm langer, heizbarer Platindraht von 0,1 mm Durchmesser, Q ein Ansatz, der mit flüssiger Luft oder einem anderen Kühlmittel gekühlt werden kann. Zum Manometersystem

[1] Chem. Weekbl. **1953**, 276—279 [Holländisch].

[2] Förch, J. H.: Chem. Weekbl. **1952**, 145; vgl. diese Z. **138**, 123 (1953).

[3] Anal. chim. Acta (Amsterdam) **2**, 452 (1948); vgl. diese Z. **130**, 423 (1949/50). (Der Name des Autors ist in dem Referat irrtümlich Goerham geschrieben.)

[4] Analyst (London) **78**, 122—126 (1953). Imp. College Sci. Technol., South Kensington, London, SW 7.

gehören außerdem die 700 mm-Skala A, das Quecksilbervorratsgefäß Z, der Hahn T_3 und die Quetschklammer K, mit deren Hilfe man das Quecksilberniveau im Druckteil um etwa 1 mm verändern kann. Folgende Dimensionen werden für den McLeod empfohlen: Capillarende 5 cm mit innerem Durchmesser von 0,5 mm; Kugelinhalt 50 ml; Anschlußrohre nicht weniger als 9 mm Durchmesser. Zur Ausführung einer Bestimmung evakuiert man zunächst den Apparat durch das Anschlußrohr 2 und läßt dann durch 1 ungefähr 20 μl des zu untersuchenden Gases eintreten. Die einzelnen Bestandteile des Gases werden nacheinander wie üblich entfernt, der Verlust wird jeweils am Manometer abgelesen. (CO_2 wird mit „Sofnolite" absorbiert, CO wird mit Hopcalit zu CO_2 verbrannt, das man absorbiert, NO wird mit flüssiger Luft ausgefroren.) Dabei ist der Vorteil dieses Unterdruck-Gasanalysators, daß die Diffusionsgeschwindigkeit so groß ist, daß mit jedem Reagens sofort schneller Kontakt eintritt, ohne daß die Gase durch die Reagentien zirkulieren müssen. Da hierfür der Anhang Q, die Verbindungsrohre und die Reagentienbehälter nicht zu klein, letztere zur Vermeidung von Volumenkorrekturen aber auch nicht zu groß sein dürfen, werden die hier gegebenen Dimensionen empfohlen. Der Erfolg der ganzen Methode hängt ab von der Geschwindigkeit und Genauigkeit der Druckmessung mit dem McLeod. H. Peters.

Eine Apparatur für die Mikroanalyse von Kohlendioxyd und Wasserstoff auf trockenem Wege, im Gemisch mit anderen Gasen, für Mengen von 5—40 ml beschreiben M. J. Marshall und G. Constabaris[1]. — Zur *Bestimmung* von CO_2 wird das Gas in die evakuierte Apparatur (Abb. im Orig.), die im wesentlichen aus einem mit Quecksilber gefüllten McLeod besteht, gebracht und mit flüssiger Luft ausgefroren. Aus der Druckdifferenz vor und nach dem Ausfrieren errechnet sich der Gehalt an Kohlendioxyd. — *Wasserstoff* kann bei Gegenwart von CO oder Methan durch Diffusion durch Palladium bestimmt werden. Die Temperatur darf dabei nicht über 325 °C steigen, da sonst Zersetzung des Methans eintritt. Das Gasgemisch kann bis zu 65% CH_4 oder CO enthalten. Nach etwa 15—20 min ist bei dieser Temperatur der gesamte Wasserstoff hindurchdiffundiert. Der Gehalt daran errechnet sich wieder aus der Druckdifferenz vor und nach dem Versuch. G. Denk.

Die massenspektrometrische Bestimmung von Gasverunreinigungen, die durch Kondensation abgetrennt werden können, beschreibt A. S. Newton[2]. Es werden sowohl nichtkondensierbare Verunreinigungen in kondensierbaren Gasen als auch kondensierbare Verunreinigungen in permanenten Gasen bestimmt. Für beide Fälle sind Beleganalysen angegeben. Als Hilfsgas wird Neon benutzt. Die Genauigkeit für nichtkondensierbare Verunreinigungen im Bereich von 30—200 Teilen auf 100000 Teile beträgt 5% der Verunreinigung, mit Ausnahme von Kohlenmonoxyd, das stets gleichmäßig um 10 Teile auf 100000 Teile und von Methan in Schwefeldioxyd, welches immer um etwa 25% zu niedrig gefunden wird. Eine größere Empfindlichkeit wurde nicht angestrebt, da die Herstellung der Eichmischungen für diesen Bereich zu schwierig und umständlich erschien. J. Rasch.

Für Titrationen von Gasen mit Gasen schlagen S. Katz und J. T. Barr[3] einen neuen Apparat vor, der aus einem Reaktionsgefäß mit magnetischem Gasmischer, Gasmeßgefäßen, Druckmessern und einer Vakuumpumpe aus korrosionsbeständigem Material besteht. Die Gasvolumina und Temperatur bleiben während der Titration konstant. Mit Hilfe von Druckmessungen werden der Titer und der

[1] Canad. J. Chem. **31**, 842—848 (1953). Univ. of British Columbia, Vancouver.
[2] Analyt. Chemistry **25**, 1746—1749 (1953). Univ. Berkeley, Calif. (USA).
[3] Analyt. Chemistry **25**, 619—624 (1953). Carbide, Carbon Chemic. Co., Oak Ridge, Tenn. (USA).

Titrationsendpunkt bestimmt. Die Methode ist nur anwendbar, wenn bei der Reaktion eine Änderung der Molzahl eintritt. Die Apparatur wurde mit der *Titration von HCl mit NH_3-Gas* ausprobiert, der Druck sinkt bei dieser Reaktion bis auf den Dampfdruck des Ammoniumchlorids und steigt bei Zugabe eines Überschusses an „Reagensgas" wieder an. Um die Anwendungsmöglichkeiten dieser Apparatur für analytische Zwecke und für das Studium von Reaktionsmechanismen festzulegen, wurden die Reaktionen zwischen gasförmigen Kohlenwasserstoffen (Paraffinen und Olefinen) mit Fluor, aber auch mit Chlor, Chlormonofluorid und Chlortrifluorid untersucht. Der entstehende Fluorwasserstoff kann dabei durch festes Natriumfluorid gebunden werden. Es werden die Typen der Reaktionen diskutiert und Beispiele für analytisch anwendbare Titrationen gegeben: *Bestimmung von Chlor-Fluormischungen, von Chlormonofluorid-Fluormischungen und von Chlortrifluorid-Fluormischungen mit Äthylen, Bestimmung von Methan-Äthanmischungen mit Fluor, von Olefinen in Kohlenwasserstoffmischungen mit Chlor und von Fluor mit Äthylen.* Die Ergebnisse zeigen, daß in manchen der untersuchten Fälle Methoden von größerer Präzision vorhanden sind, jedoch sind die Gastitrationen allgemeiner anwendbar als viele andere Methoden; wenn eine Genauigkeit in der Größenordnung von 3% zufriedenstellend ist, so kann man mit Hilfe der Gastitrationen oft wesentlich rascher arbeiten. Barbara Grüttner.

Zur Stickstoffbestimmung in Edelgasen empfiehlt H. S. Dombrowski[1] die *Absorption in metallischem Titan* bei 900—1000° C. Man leitet das zu untersuchende Edelgas bei 1050° C Ofentemperatur in einem Quarzrohr über 10 g in einem Quarzschiffchen eingewogenes Titan, dessen Stickstoffgehalt vorher genau ermittelt wurde. Die Strömungsgeschwindigkeit soll 3—4 l je Minute betragen. Nachdem 600 l des zu untersuchenden Gases, z. B. Argon oder Helium, durchgeleitet wurden, läßt man abkühlen und kann nun aus der Gewichtszunahme und durch eine Stickstoffbestimmung nach einer modifizierten Kjeldahl-Methode[2] den Gehalt an Gesamtverunreinigungen und den Stickstoffgehalt des untersuchten Edelgases ermitteln. Es lassen sich größere Stickstoffmengen ebenso gut wie auch nur einige ppm. (0,0001 Vol%) bestimmen. Die Bestimmung der Gesamtverunreinigungen ist nicht so genau wie die des Stickstoffs. K. Brodersen.

Die Analyse von Mischungen, die Stickstoffoxyd enthalten, bereitet wegen dessen Reaktionsfähigkeit erhebliche Schwierigkeiten. R. A. Friedel, A. G. Sharkey jr., J. L. Shultz und C. R. Humbert[3] umgehen dies Hindernis indem sie die NO_2-haltigen Proben mit einem *Massenspektrometer* unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen analysieren.

Die üblichen Hahnfette und Pumpöle müssen gegen Silicon-Hochvakuumfett und Siliconpumpenöl DC 703 ausgetauscht werden. Das Gaseinlaßsystem des Massenspektrometers Typ 21—103 der Consolidated Engineering Corp. ist aus rostfreiem Stahl, desgleichen sind es die Ventile, die mit Federungskörpern aus VA-Stahl ausgerüstet sind. Die Gasvorrats- und Ausdehnungsgefäße sind aus Glas. Eine besondere Einrichtung gestattet die Einführung mehrerer Proben ohne Aufhebung des Vakuums. Um stabile Verhältnisse zu bekommen müssen zuerst verschiedene NO_2-Probeläufe bei den in Betracht kommenden Drucken (Partialdruck 0,2—0,02 Torr) durchgeführt werden. Wenn der Betrieb unterbrochen wird, ist die Präparation aufrechtzuerhalten, indem NO_2 mit einem Druck von 0,1 Torr solange gegeben wird, bis der Betrieb wieder aufgenommen wird. Nach der Vorbehandlung sind die

[1] Analyt. Chemistry **26**, 526—528 (1954). E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc., Newport, Del. (USA).

[2] Thompson, J. M.: Analyt. Chemistry **25**, 1231 (1953).

[3] Analyt. Chemistry **25**, 1314—1320 (1953). Bureau of Mines, Bruceton, Pa. (USA).

Empfindlichkeiten reproduzierbar. Diese Reproduzierbarkeit muß für Masse 46 u. 30 laufend überprüft werden. Ist ein Gerät präpariert, so genügt zur täglichen Neupräparation ein Lauf von 1 Std mit 0,1 Torr NO_2. Ab 0,015 Torr Partialdruck NO_2 und höher ist die Empfindlichkeit konstant, darunter sinkt sie, doch ist eine Erhöhung durch Vergrößerung des Elektronenstroms der Ionenquelle von 10 μA auf 50 μA möglich. Bei Ionenquellentemperaturen unter 250 °C wird die Empfindlichkeit ebenfalls größer. Die genaue *Bestimmung von* NO_2, NO, N_2O, CO_2, CO, N_2, O_2, H_2O *und* H_2 *nebeneinander* ist durchaus möglich. Stickoxydul und Kohlendioxyd sind durch das doppelt geladene Ion der Masse 22 zu unterscheiden, das nur von CO_2 herrührt. — Zur Durchführung der Analysen empfiehlt sich die Verwendung von Eichkurven, die laufend überprüft werden müssen. Zur Überwachung verwendet man praktischerweise keine Standardmischungen, sondern reines NO_2 bei entsprechenden Drucken. Die äußerste Nachweisgrenze ohne besondere Anreicherungsmaßnahmen ist 0,05 Mol-%, entsprechend $5 \cdot 10^{-5}$ Torr. Bei noch niedrigeren Gehalten kann man dieses zuvor ausfrieren und dann zur Analyse bringen. Es werden ausführliche Eichschemata für NO_2, NO und N_2O und Beleganalysen gebracht. Die Genauigkeit liegt bei 1% und besser. Der Zeitbedarf beträgt für 20 Proben etwa 13 Std einschließlich Berechnungen. J. Rasch.

Ein Registriergerät zur laufenden Bestimmung des Sauerstoffgehaltes von Gasen, das auf einer elektrochemischen Methode aufgebaut ist, hat M. G. Jacobson[1] entwickelt. Da die Potentialabhängigkeit einer Sauerstoffelektrode vom Sauerstoffpartialdruck in einer Grove-Zelle nur sehr gering sein kann (der Unterschied zwischen 16 und 21% O_2 kann nur 1,5 mV bringen), da die Sauerstoffelektrode nicht reversibel arbeitet und zudem nur langsam Gleichgewichtseinstellung erreicht, wird nach A. Paris[2] eine Zelle nach Fery verwendet und der von der Sauerstoffzufuhr abhängige Stromfluß eines Zn-C-Elementes über einen passenden konstanten Widerstand zur Anzeige des Sauerstoffgehalts ausgenutzt. Wird das Element so konstruiert, daß die Stromdichte hierbei möglichst groß ist, so wird nicht allein eine hohe Einstellgeschwindigkeit (1—2 sec) sondern außerdem noch erreicht, daß die Stromdichte sich dem Kehrwert der Quadratwurzel aus der Oberfläche linear proportional verhält[3]. — Der Aufbau der Zelle, in der das zu analysierende Gasgemisch durch die röhrenförmige Kohlekathode strömt und in der „Oxylith" (p_H 3,0) als Elektrolytlösung dient, ist genau beschrieben. Die Zelle wird elektrisch beheizt, so daß die Temperatur auf ± 1% genau konstant und einige Grade über der höchstens zu erwartenden Temperatur gehalten wird. Der Gasstrom wird weitgehend automatisch konstant gehalten, muß mehr als 20 ml/min (maximal 2 l/min) betragen und darf maximal einen Druck von 15 cm Wassersäule führen. Gegenüber den Angaben von Paris angebrachte Verbesserungen der Meßschaltung sind ebenfalls ausführlich erörtert. Das Gerät ist mit einem Eichgemisch und einem sauerstofffreien Gas zu eichen. Kohlenoxyd und bis zu 24% Kohlendioxyd stören nicht. K. Cruse.

H. A. C. van Straten[4] benutzt zur *Bestimmung kleiner Sauerstoffgehalte in Gasen* die Manganhydroxydmethode nach Winkler, die dadurch verbessert wird, daß man die Reagentien im Vakuum bei höheren Temperaturen entlüftet. Auch

[1] Analyt. Chemistry **25**, 586—591 (1953). Mine Safety Appliances Co., Pittsburgh, Pa. (USA).

[2] Chim. et Ind. **31**, 253 (1933); vgl. auch. K. Kordesch u. A. Marco, Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **36**, 420 (1950); vgl. diese Z. **135**, 362 (1952).

[3] Jacobson, M. G., USPatent 2156093 (1939), 2464087 (1949) und 2540674 (1952).

[4] Anal. chim. acta (Amsterdam) **10**, 243—255 (1954). Shell-Lab., Amsterdam.

die Mangan(II)-hydroxydkonzentration und die Schüttelzeit sind von Einfluß. Ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Acetylen und Kohlenoxyd stören nicht. Sauerstoffkonzentrationen von 0,1—4 Vol% lassen sich auf $\pm$ 3,6% genau bestimmen, bei Sauerstoffmengen kleiner als 0,1 Vol% beträgt die Reproduzierbarkeit $\pm$ 0,004%. — *Ausführung.* In ein verschließbares, mit Hahn versehenes Gefäß von 1 l Inhalt (Abb. im Original) bringt man 5 ml 30%ige Mangan(II)-chloridlösung, 100 ml Wasser, einige Siedesteinchen und in einem Reagensglas 5 ml alkalische Kaliumjodidlösung (195 g KJ und 390 g KOH/Liter), die noch nicht mit der Manganchloridlösung in Berührung kommt. Nun evakuiert man weitgehend und erhitzt auf etwa 50° C, wobei die Flüssigkeit stark kocht und luftfrei wird. Nach 15 min läßt man das geschlossene Gefäß abkühlen, füllt zweimal mit dem zu untersuchenden Gas und evakuiert zwischendurch. Nachdem das Gefäß hierauf endgültig mit einem bekannten Volumen des zu untersuchenden Gases gefüllt ist, wägt man es, schüttelt dann 1 Std, gibt 10 ml 20%ige Salzsäure zu, ohne daß Luft hereingelangen kann, schwenkt um, öffnet und titriert das in Freiheit gesetzte Jod mit Natriumthiosulfatlösung. Nun füllt man das Gefäß vollständig mit Wasser und wägt es wieder. Den Sauerstoffgehalt des Gases berechnet man nach folgender Formel: Vol% $O_2 = A \times N \times 560/V$, wobei A die Milliliter verbrauchte Thiosulfatlösung, N deren Normalität und V das Volumen (Milliliter) des Gases (reduziert auf Normalbedingungen) bedeuten. K. Brodersen.

Zur Bestimmung geringer Mengen Sauerstoff in Wasserstoff leitet M. M. Wright[1] das Gas über einen Platinkatalysator, friert das gebildete Wasser mit flüssigem Stickstoff aus und mißt sein Volumen bei 10 mm Druck. In der verwendeten Apparatur können in einer Gasmenge von 1,3 Liter noch 0,00005% O_2 mit einer Genauigkeit von $\pm$ 10% (0,002% O_2 auf $\pm$ 2% genau) erfaßt werden. Die Analysendauer beträgt etwa 1 Std. — *Ausführung.* Vor der Inbetriebnahme wird die Apparatur (6 Skizzen im Original) erst evakuiert, dann mit Wasserstoff gefüllt und dieser mehrere Stunden mit einer Töpler-Pumpe über erhitzte Platinwolle geführt, um adsorbierten Sauerstoff und Wasserstoff zu entfernen. Für die Analyse evakuiert man die Apparatur ebenfalls, läßt die Gasprobe einströmen, entfernt den Wasserdampf und andere kondensierbare Gase durch Kühlung, führt dann das Gas über den erhitzten Katalysator und kondensiert das Wasser in einer Falle, die mit flüssigem N_2 gekühlt ist. Anschließend wird der Wasserstoff abgepumpt, die Kühlfalle auf 25° C erwärmt, der Wasserdampf in das Meßgefäß überdestilliert und sein Volumen bei 10 mm Hg gemessen. Die Zeiten für die einzelnen Arbeitsgänge, Evakuieren, Umpumpen, Überdestillieren sollen gleich gehalten werden, die Raumtemperatur soll während einer Analyse auf 1—2° C konstant bleiben. — Mit Wasserstoff, der bekannte Mengen O_2 enthält, wird eine Eichkurve aufgestellt.

Zur Untersuchung von Reaktionen zwischen festen Stoffen und Gasen, speziell für die Messung der *Absorption von Sauerstoff durch Kohle* zwischen Zimmertemperatur und 120° C verwenden Ph. Souter, J. R. Willimott und T. G. Hunter[2] eine manometrische Methode. Die Versuche werden in einer Warburg-Apparatur durchgeführt, bei der das Wasserbad durch ein Ölbad ersetzt ist. Die Temperatur ist auf $\pm$ 0,02° C konstant. CO_2 und H_2O werden mit KOH-Plätzchen bzw. wasserfreiem $Mg(ClO_4)_2$ absorbiert. — *Ausführung.* Von der Kohleprobe (1,1 —0,04 mm C), die sich in evakuierten Ampullen befindet, wird in jedes Reaktionsgefäß etwa 1 g

[1] Analyt. Chemistry **26**, 1001—1008 (1954). Consolid. Mining and Smelting Co., Ltd., Trail, B. C. (Canada).

[2] Analyt. Chemistry **26**, 484—487 (1954). Univ. Sydney, Australien.

eingewogen. Die dabei aufgenommene O_2-Menge ist unerheblich. Ferner wird jedes Gefäß mit etwa 0,5 g $Mg(ClO_4)_2$ beschickt und dann mit dem Manometer verbunden. Nachdem man 4 min Sauerstoff, der über Magnesiumperchlorat getrocknet wird, hindurchgeleitet hat, bringt man die Gefäße in das Temperaturbad und beginnt 3 min später mit der Ablesung. Ein Gefäß, in dem sich keine Kohle befindet, dient zur Ermittlung des Blindwertes. Die absorbierte Menge Sauerstoff unter Normalbedingungen ist $x = h \cdot v_G \cdot (273 : T) \cdot (1 : P_0)$; dabei bedeutet h die Druckänderung in Millimeter der Manometerflüssigkeit, v_G den Gasraum in μl (Volumen der Apparatur minus Volumen der festen Substanzen), T die absolute Temperatur und P_0 die Millimeter Manometerflüssigkeit, die 760 mm Hg entsprechen. — Die Genauigkeit der Messung beträgt $\pm$ 3%.

D. L. Manning und J. C. White[1] entwickeln eine Methode zur *Bestimmung von Spuren von Fluorwasserstoff in inerten Gasen*. Das Gas wird durch eine Lösung von Borsäure geleitet. Die sehr geringe Eigenleitfähigkeit der Borsäurelösung nimmt dabei proportional der Menge HF zu, da sich nach der Gleichung $H_3BO_3 + 3\,HF = HBF_3OH + 2\,H_2O$ eine starke Säure bildet. Mengen von 10—1000 μg HF können so mit einer Genauigkeit von $\pm$ 10 μg ermittelt werden. Bei größeren Mengen an Fluorwasserstoff ist die Proportionalität nicht mehr gewahrt. Zur Absorption wurden 100 ml Borsäurelösung von 0,0003—0,16 m verwendet. Bei niedriger Konzentration an HF bleibt die Leitfähigkeit der Lösung bis zu 30 min konstant, während sie in konzentrierteren (0,5 m) zunimmt, da hier weitere Hydrolyse der Hydroxofluoroborsäure eintritt. Selbstverständlich stören alle Gase, die mit Wasser ebenfalls Ionen bilden.

Eine Apparatur zur fraktionierten Destillation aggressiver Gasgemische, wie Cl_2, F_2, HF, entwickelten N. C. Orrick und J. D. Gibson[2]. Der Destillationskolben von 20 ml Inhalt besteht aus Nickel, ebenso der Fraktionieraufsatz, dessen oberer Teil mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden kann und als Rückflußkühler dient. Die Temperatur wird mit einem Kupfer-Konstantan-Thermoelement gemessen, der Druck mit einem Quecksilbermanometer, welches vor dem Angriff der Gase durch einen Drucküberträger geschützt ist. Sämtliche Hähne sind vakuumdicht, sie bestehen aus Bronze und polymeren Chlortrifluoräthylen. (Zeichnung der Apparatur im Original.) Mit dieser Anordnung ist es möglich, Gemische von Gasen im Temperaturbereich von — 150 C bis — 25 C für qualitative Zwecke zu trennen, wenn ihre Siedepunkte um mindestens 10 C auseinander liegen. Die quantitative Bestimmung oder Reindarstellung gelingt dann, wenn die Siedepunkte um mindestens 30° C differieren. G. Denk.

Zur Bestimmung des Mischungsverhältnisses Luft-Brennstoff in den Abgasen von Verbrennungsmotoren verwendet E. F. Weller[3] ein akustisches Verfahren. Es beruht darauf, daß die Schallgeschwindigkeit in einem Gas proportional seinem Molekulargewicht ist. Wenn das Gas aus zwei ungleichen Bestandteilen zusammengesetzt ist, ist die Schallgeschwindigkeit eine Funktion des Verhältnisses der Molekulargewichte der beiden Gase. Die Gesetzmäßigkeit gilt auch, wenn drei Gase zugegen sind, vorausgesetzt, daß die Konzentration des dritten Gases konstant gehalten wird. Das zu untersuchende Abgas wird durch Leiten über glühendes Kupfer und Kupferoxyd in ein solches Zweikomponentensystem ($N_2 + CO_2$) verwandelt; die Konzentration des außerdem vorhandenen Wasserdampfes wird auf

[1] Analyt. Chemistry **25**, 1648—1650 (1953). Nation. Lab., Oak Ridge, Tenn. (USA).

[2] Analyt. Chemistry **25**, 1100—1103 (1953). Carbide and Carbon Chem. Corp., Oak Ridge, Tenn. (USA).

[3] Analyt. Chemistry **26**, 488—491 (1954). General Motors Corp., Detroit, Mich.

einem konstanten niedrigen Wert gehalten. Das Gas wird in die akustische Prüfzelle geleitet, die an ihren gegenüberliegenden Seiten zwei elektroakustische Ultraschallerzeuger enthält. Die Schallgeschwindigkeit wird gemessen und elektrisch aufgezeichnet. Der kompendiöse Apparat, dessen Einzelteile und Gesamtaufbau abgebildet sind, registriert alle 30 sec die Zusammensetzung von reichen oder armen Gasgemischen mit einem Fehler von höchstens $\pm$ 1%. Das neue Verfahren ist also genauer als die Analyse im ORSAT-Apparat und arbeitet außerdem viel rascher. A. SCHLEICHER.

Eine schnelle und genaue Methode zur Analyse von Synthesegas entwickelten G. L. BARTHAUER, A. HAGGERTY und R. J. FRIEDRICH[1]. Die exakte Bestimmung der Komponenten (H_2, CO_2, CO, CH_4) ist vor allem deshalb schwierig, weil der Gehalt an Wasserstoff rund 98% beträgt. — Das Gasgemisch wird mit Sauerstoff bei 500—600° C am Pt-Pd-Kontakt verbrannt, die Reaktionsprodukte werden mit geeigneten Absorptionsmitteln aufgefangen und gewogen. (Zeichnung und genaue Beschreibung der Apparatur im Original.) — Wenn mehr als Spuren inerter Gase vorliegen, muß eine der verbrennbaren Substanzen getrennt bestimmt werden. Am einfachsten ist dabei die Bestimmung des Methans durch die wiederholt beschriebene *Ultrarctanalyse*[2, 3]. G. DENK.

II. Spezielle analytische Methoden.

1. Auf Lebensmittel und Gesundheitspflege bezügliche.

Über Nachweis, Trennung und Identifizierung von synthetischen Farbstoffen in Lebensmitteln berichtet W. LHOEST[4] in einer ausführlichen Arbeit. Zunächst wird ein Überblick und eine Zusammenstellung verschiedener klassischer Methoden und ihre Anwendung zum Nachweis der Farbstoffe (wie Indigotin, Patentblau, Tartrazin, Chrysoidin, Ponceau R und 2 R, Erythrosin u. a.), die in Belgien zur Lebensmittelfärbung zugelassen sind, gegeben. — Zum *papierchromatographischen Nachweis* empfiehlt Verf. folgende Methode: Man extrahiert den Farbstoff aus den Lebensmitteln und fertigt zur Trennung ein Chromatogramm an, wobei man als Lösungsmittel ein Gemisch von n-Butanol, Äthylalkohol und dest. Wasser (2:1:1) verwendet. Dann schneidet man den Farbfleck aus, teilt ihn in 2 Teile und tropft auf die eine Hälfte eine Vergleichslösung des zu erwartenden Farbstoffes und auf die andere Hälfte 2 Farbstoffe mit den nächstliegenden R_f-Werten. Jede der beiden Hälften behandelt man nun getrennt weiter, und zwar legt man jeden Farbfleck zwischen 2 Glasplatten auf einen neuen Chromatogrammstreifen und behandelt je nach der vorliegenden Farbe mit einem entsprechenden Lösungsmittel unter einem bestimmten Druck. Zur Überprüfung der Methode kamen mehrere Farbstoffmischungen zur Untersuchung, die zum Vergleich sowohl nach der oben geschilderten Methode, als auch nach dem allgemein üblichen Chromatographieverfahren behandelt wurden. Dabei konnten vollkommen identische Farbflecke mit gleichem R_f-Wert erhalten werden. — Zur *quantitativen Bestimmung der Farbstoffe* schlägt Verf. die *colorimetrische Methode* vor. Dabei sollte, da verschiedene Farbstoffe p_H-abhängig sind, ein bestimmter p_H-Wert eingehalten werden. Als Puffer wird n Salz-

[1] Analyt. Chemistry **25**, 256—259 (1953). Pittsburgh Consolidation Coal Co., Library, Pa. (USA).

[2] SEYFRIED, W. D., and S. H. HASTINGS: Analyt. Chemistry **19**, 303 (1947).

[3] STROUPE, J. D.: Analyt. Chemistry **22**, 1125 (1950); vgl. diese Z. **134**, 114 (1951/52).

[4] J. Pharmac. Belgique, N. S. **36**, 371—389 (1954). Univ. Löwen (Louvain).

säure empfohlen und für salzsäureunlösliche Farbstoffe ein Acetatpuffer vom p_H-Wert 4,5. In einer Tabelle wird für eine Reihe von Farbstoffen der jeweilige Puffer und die entsprechende Wellenlänge zur colorimetrischen Bestimmung angegeben. Einzelheiten der Verfahren mögen der Originalarbeit entnommen werden.

Doris Heiligmann.

Zur Bestimmung von ätherischen Ölen in Gewürzen empfiehlt H. Hadorn[1] die Anwendung der Oxydationsmethode in einem speziell dafür konstruierten kleinen Apparat. Als Oxydationsmittel dient eine Dichromat-Schwefelsäurelösung, deren unverbrauchter Überschuß jodometrisch bestimmt wird. Als Reaktionstemperatur wird 105° C angegeben. Doris Heiligmann.

Mit der papierchromatographischen Charakterisierung der natürlichen Prinzipien der Vanille und ihrer Unterscheidung von Äthylvanillin haben sich S. Stoll und Y. Bouteville[2] beschäftigt. Sie ziehen dabei die wirksamen Anteile aus Vanilleextrakten auf folgende Weise aus: Abdampfen des Alkohols unter laufendem Ersatz durch Wasser, um die Konzentration konstant zu halten, Klären und Entfernen störender Substanzen mit basischem Bleiacetat, das man mindestens 12 Std einwirken läßt, Zentrifugieren und Ausschütteln der klaren Lösung mit Äther. Dieser nimmt dann folgende Substanzen auf: Vanillin, Äthylvanillin, Vanillinsäure, Piperonal, Cumarin. Im Scheidetrichter werden durch Behandlung mit Ammoniak Vanillin, Äthylvanillin, Vanillinsäure und ein Teil des Piperonal abgetrennt, während der Rest von Piperonal und Cumarin im Äther bleiben. Die in die ammoniakalische Lösung übergehenden Substanzen werden nach Ansäuern mit Salzsäure mit Äther wieder extrahiert. Aus den beiden ätherischen Lösungen werden die Substanzen in alkoholische Lösungen übergeführt. Für die davon auf das Papier aufzutragenden Mengen gilt als Anhaltspunkt, daß die einzelnen Komponenten mit 10—20 γ vorliegen sollten. Es wird nach der aufsteigenden Methode mit Butanol-Ammoniak als Fließmittel gearbeitet. Zum Vergleich wird eine Mischung der zu erwartenden Substanzen mit aufgetragen. Bei der Anwendung der für diese aldehydischen Substanzen geeigneten Entwickler wie Ammoniakgas, 2,4-Dinitrophenylhydrazin, Benzidinchlorhydrat ergab sich der zunächst unverständliche Befund, daß auch die echten Vanilleextrakte einen Flecken lieferten mit dem gleichen R_f-Wert und der gleichen Färbung wie Äthylvanillin, der sich bei Zugabe von Äthylvanillin nur noch verstärkte. Erst bei Entwicklung mit Hydrazinsulfat nach K. G. Bergner und H. Seerlich[3] zeigte der fragliche Flecken im UV-Licht deutliche Unterschiede in der Farbe (gelbgrün) im Vergleich mit dem Flecken aus reinem Äthylvanillin (gelbbraun). Diese Unterschiede waren auch bei gleichzeitiger Anwesenheit der beiden Substanzen zu erkennen. Natürlicher Vanilleextrakt ist danach frei von Äthylvanillin. Mit Hilfe der papierchromatographischen Methode und der Entwicklung mit Hydrazinsulfat ist es also möglich, den Zusatz von Äthylvanillin zu Vanilleextrakten zu erkennen.

In einer weiteren Untersuchung haben P. Chovin, S. Stoll und Y. Bouteville[4] den Inhaltsbestandteil der natürlichen Vanilleextrakte, der im R_f-Wert und in einigen Farbreaktionen mit Äthylvanillin übereinstimmt, näher untersucht. Er konnte durch Reaktionen der Aldehyd-, der phenolischen Hydroxylgruppe, durch Elementaranalyse, ultrarotspektrographisch, durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt als p-Oxybenzaldehyd identifiziert werden. L. Acker.

[1] Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. (Bern) **45**, 71—72 (1954). Basel.
[2] Ann. Falsificat. Fraudes **47**, 183—187 (1954). Lab. Munic., Préfect. de Police.
[3] Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. **47**, 134 (1951).
[4] Ann. Falsificat. Fraudes **47**, 187—191 (1954).

Für die Vanillinbestimmung in Vanille-Extrakten benützt Ch. Lagneau[1] die colorimetrische A.O.A.C.-Methode[2] mit dem Reagens von Folin und Denis (Phosphowolfram-phosphomolybdänsäure). Die Reaktion ist nicht spezifisch für Vanillin; Äthylvanillin reagiert ebenfalls mit blauer Farbe. Anisaldehyd und Piperonal geben ebenfalls Färbungen, die allerdings so schwach sind, daß der Einfluß dieser Substanzen innerhalb der analytischen Schwankungen der Methode bleibt. Wenn auch Äthylvanillin in Vanilleextrakten nicht vorkommt, so ist aber die Tatsache, daß es in gleicher Weise wie Vanillin reagiert, bei der Untersuchung von Vanillinzucker zu beachten. Für den genannten Zweck hat sich die Methode nach den Erfahrungen des Verf. bewährt. — Zur Unterscheidung zwischen Vanillin und *Äthylvanillin* (als Fälschungsmittel) wird die Papierchromatographie herangezogen (aufsteigendes Verfahren). Als Lösungsmittel dient bei 22° C mit Ammoniak gesättigtes n-Butanol, die Laufstrecke beträgt 240 mm, die Breite des Papiers (Whatman 1) 90 mm. Es wurden jeweils 3 Flecken (davon zwei für die Vergleichssubstanzen) aufgetragen. Zur Entwicklung diente Benzidinchlorhydratlösung oder eine alkoholische Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazinhydrochlorid, jedoch wird dem ersten Reagens der Vorzug gegeben. Die R_f-Werte werden für Whatman Nr. 1 bei 18—20° C mit 0,42—0,43 für Vanillin, 0,55 für Äthylvanillin und 0,89 für Piperonal angegeben. Trotz der geringfügigen Unterschiede im R_f-Wert sollen die Flecken von Vanillin und Äthylvanillin deutlich voneinander abgesetzt sein. L. Acker.

Zur Bestimmung von Phenolphthalein in schokoladeähnlichen Erzeugnissen empfehlen S. Doernberg, M. Hubacher und I. Lysy[3] eine potentiometrische Titration *in nichtwäßrigen Lösungsmitteln*. Verf. modifizieren hierzu die für die Bestimmung von Phenolen von M. L. Moss, J. H. Elliot und R. T. Hall[4] vorgeschlagene Methode; als Lösungsmittel wird eine Mischung von 15% Äthylendiamin und 85% Pyridin gewählt. — *Arbeitsweise*. Eine bestimmte Menge der Probe, die ungefähr 80—100 mg Phenolphthalein enthält, wird in einem Gooch-Tiegel durch dreimaliges Extrahieren mit jeweils 5 ml Tetrachlorkohlenstoff entfettet, das Phenolphthalein mit Hilfe eines Trichters unter schwachem Saugen dreimal mit je 5 ml Aceton in eine Grignard-Flasche extrahiert und auf dem Wasserbad vom Lösungsmittel befreit. Man kühlt ab, fügt 25 ml Pyridin (Kp 114—115° C) und 5 ml wasserfreies Äthylendiamin (D 0,90) zu, mischt mit Hilfe eines Rührers durch und gibt weiter 3 Tropfen Indicatorlösung zu (1 g Thymolblau in 100 ml Pyridin). Nach Einschalten der Elektroden titriert man mit folgender Maßlösung: 1,25 g metallisches Natrium werden in 100 ml Äthanolamin gelöst und mit Pyridin auf 500 ml aufgefüllt. Der Titer wird gegen Benzoesäure eingestellt. Man läßt die Maßlösung zunächst unter Rühren aus einer Bürette, die über der mittleren Öffnung der Grignard-Flasche angebracht wurde, bis zum Farbumschlag von Gelb nach Grünlichgelb zufließen. Der abgelesene Wert ergibt den Blindwert. Zur Bestimmung des Endpunkts verfährt man so, daß man gegen Ende der Titration nach Zugabe von jeweils 0,1 ml der Titrationsflüssigkeit die entsprechende Potentialdifferenz abliest. Die größte Differenz ergibt den Endpunkt. Der Gehalt an Phenolphthalein ergibt sich aus den verbrauchten ml Titrationsflüssigkeit (Endpunktblindwert) × 0,0159.

Verff. beschreiben ferner ausführlich die zur Bestimmung notwendige Apparatur. In einer Tabelle werden die Werte verschiedener Untersuchungsreihen mit den nach

[1] Ann. Falsificat. Fraudes **46**, 432—437 (1953).

[2] Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 6. Aufl. 1945, S. 366.

[3] J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. **43**, 418—420 (1954). Ex-Lax., Inc., Brooklyn, N. Y. (USA).

[4] Analyt. Chemistry **20**, 784 (1948).

der gravimetrischen Methode erhaltenen Ergebnissen verglichen, dabei konnte eine gute Übereinstimmung festgestellt werden. Zur Überprüfung der Genauigkeit der Methode wurden verschiedene Mengen Phenolphthalein zum Lösungsmittel zugesetzt und das Phenolphthalein wie oben beschrieben bestimmt, dabei ergab sich eine mittlere Abweichung von $\pm$ 0,74%. Doris Heiligmann.

Carotin. *Zur Bestimmung in Futter- und Lebensmitteln* geben K. Scharrer und R. Bürke[1] eine Kritik verschiedener Bestimmungsmethoden und teilen ihre auf Grund der Erfahrungen mit verschiedenen Verfahren ausgearbeitete Methode mit. — *Arbeitsvorschrift für Möhren, Karotten und frisches grünes Pflanzenmaterial.* 5 g Substanz (mit 200—250 μg Carotin) verreibt man mit der gleichen Menge Quarzsand und 1—2 Tropfen 2%iger NaCl-Lösung, was nach Zugabe von 5 ml Methanol wiederholt wird. Die flüssige Phase wird durch Absaugen abgetrennt, der Filterrückstand noch 2—3mal mit insgesamt 30—50 ml Methanol aufgerührt, vorsichtig verrieben und wieder abgesaugt. Beim weiteren Arbeiten wird durch Durchleiten von CO_2 die Oxydation des Carotins zu verhindern gesucht. Nun folgt eine mehrmalige Behandlung des Filterrückstandes mit kleinen Mengen an leichtsiedendem Petroläther (insgesamt etwa 30—40 ml), bis das Filtrat farblos ist. Alle Filtrate werden in einem Scheidetrichter gesammelt. Nun wird $^1/_9$ des Volumens der Methanolphase an Wasser zugefügt und die Petrolätherschicht auf das gleiche Volumen wie die Methanolschicht gebracht. Nach Vertreiben der Luft durch CO_2 wird vorsichtig geschüttelt. Dabei geht die Hauptmenge des Carotins in die Petrolatherphase über. Die Methanolschicht wird nach Abtrennen noch 2—3mal mit je 10 ml Petroläther ausgeschüttelt. Der gesamte Petrolätherextrakt wird anschliessend 2mal mit je 30—50 ml Wasser gewaschen, durch eine mit wasserfreiem Na_2SO_4 gefülltes Standrohr gesaugt und bei leichtem Vakuum und unter Einleiten von CO_2 auf 2—4 ml eingeengt. Zur Chromatographie wird mit kleinen Abänderungen die von A. Fujita, T. Narita und M. Ajisaka[2] angegebene Apparatur benützt. Je nach den verwendeten Adsorbentien [entweder $Ca(OH)_2$ oder ein Gemisch gleicher Teile Aluminiumoxyd und wasserfreies Natriumsulfat; wirksame Länge der Säule 10—15 cm], die unter Petroläther eingefüllt worden sind, wird die Elution in verschiedener Weise vorgenommen. In beiden Fällen erfolgt die Überführung des Extraktes auf die Säule und das Nachwaschen mit geringen Mengen an Petroläther in gleicher Weise. Bei $Ca(OH)_2$ wird mit der Elution des β-Carotins mit 1—2% Aceton enthaltendem Petroläther erst dann begonnen, wenn das α-Carotin quantitativ ins Filtrat gegangen ist, während bei dem andern Gemisch mit der Elution mit etwa 5—8% Aceton enthaltenden Petroläther begonnen werden kann, wenn nach Zugabe des Extraktes mit 5 ml Petroläther nachgewaschen wurde. Das Carotin wird in einem Reagensglas aufgefangen, zu einem bestimmten Volumen aufgefüllt und im Zeiß-Wechsellichtphotometer oder Elko II bei Filter S 45 photometriert. — Berechnung: $x = f.E.v/a$, wobei $x = \mu$g Carotin in 1 g Substanz, f = 2,08 für α- und 2,04 für β-Carotin, E = abgelesene Extinktion, v = Vol. der Petrolätherlösung nach der Verdünnung, a = Einwaage in Gramm ist.

Arbeitsvorschrift für Tomaten. Etwa 20—25 g Tomatenbrei werden in einem Jenaer Glasfilter 11 G 1 eingewogen, mit 5—8 g wasserfreiem Natriumsulfat und 3—4 Tropfen einer 2%igen Natriumcyanidlösung vermischt und mit 20—30 ml Methanol entwässert. Der abgesaugte methanolische Extrakt wird zur Entfernung der Carotinfarbstoffe in einem Scheidetrichter 2—3mal mit je 10 ml leichtsiedendem Petroläther extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden 2mal mit Wasser alkohol-

[1] Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde **62**, 193—210 (1953). Justus-Liebig-Hochsch., Gießen.

[2] Biochem. Z. **308**, 420 (1941).

frei gewaschen. Die entwässerte Tomatensubstanz wird jetzt 5—6mal mit je 25—30 ml eines Petroläther-Acetongemisches (3:2) (im Liter 1 g Hydrochinon zur Verhütung der Oxydation enthaltend) extrahiert, bis das Filtrat farblos abläuft. Diese Extrakte werden in einem Scheidetrichter unter CO_2 durch Zugabe von 3mal je 5—10 ml Wasser von der Hauptmenge Aceton befreit, dann durch 3—4malige Zugabe von 30—50 ml Wasser von Aceton freigewaschen. Die vereinigten Petrolätherextrakte werden mit Natriumsulfat entwässert und auf 5—8 ml eingeengt. (Der Rückstand darf nicht nach Aceton riechen, andernfalls ist nach Zugabe von 10—20 ml Petroläther nochmals zu destillieren.) Anschließend wird chromatographiert an einer Säule aus „Aktivierter Magnesia 2641" (Westvoco Chemicals) und „Hyflo-Super-Cel" (Kieselgur; Johns-Manville-Product) (1:1). Sobald der Extrakt von der Säule aufgenommen ist, wird mit 6—8% Aceton enthaltendem Petroläther eluiert, wobei Carotin wesentlich rascher wandert als Lycopin und eine unter diesem befindliche Zone (wahrscheinlich Neolycopin), so daß eine quantitative Abtrennung des Carotins möglich ist. Das Filtrat wird auf 100 ml mit Petroläther aufgefüllt und wie oben beschrieben photometriert. L. Acker.

Zur Bestimmung von Carotin in Luzernenmehl wurde die A.O.A.C.-Methode von E. M. Bickoff, A. L. Livingston und G. F. Bailey[1] im Hinblick auf ihre Fehlerquellen untersucht. Verff. stellten fest, daß insbesondere die einstündige Heißextraktion sowohl eine Reisomerisation des Carotins als auch Carotinverluste durch Oxydation verursachen kann, was bei der Kaltextraktion (16 Std im Dunkeln) nicht oder kaum der Fall ist. Außerdem ist die Carotinextraktion in beiden Fällen nicht quantitativ. Weitere Fehler werden verursacht bei der chromatographischen Reinigung infolge schwankender Aktivität des Adsorbenses und durch unvollständige Elution, ferner durch miteluierte andere Farbstoffe und durch teilweise Zersetzung des Carotins auf der Kolonne. Eine Modifikation der A.O.A.C.-Methode, die vom Western Regional Research Laboratory ausgearbeitet wurde (W.R.R.L.-Methode) ergab um mindestens 5% höhere Werte als das Originalverfahren. Verff. empfehlen die W.R.R.L.-Methode wegen ihrer Einfachheit für Reihenuntersuchungen. H. Sperlich.

Den Einfluß von Antioxydantien auf die Carotin-Bestimmung studiert V. H. Booth[2]. Beauchene u. Mitarb.[3] hatten beobachtet, daß mit dem Antioxydans NN′-Diphenyl-p-phenylendiamin (D) behandeltes *Alfalfamehl* scheinbar einen höheren Carotin-Gehalt aufwies als unbehandeltes Mehl, wenn die Reinigung der carotinhaltigen Auszüge über eine Magnesiumoxydsäule erfolgte. Die Ursache der Fehler ist, daß MgO mit D unter Bildung gelbgefärbter Substanzen reagiert. Demgegenüber weist Verf. nach, daß diese Reaktion nicht erfolgt, wenn die Extraktion des Alfalfamehles mit Leichtpetroleum durchgeführt wird und die nachfolgende Chromatographierung über eine Aluminiumoxydsäule erfolgt. Auch bei Verwendung von entfettetem Bohnenmehl werden gute Resultate erhalten. Selbst große Mengen D beeinflussen bei Einhaltung der beschriebenen Bedingungen die Analysenwerte nicht. Die Extinktion von 1 mg D bei 450 mμ war nicht höher als die von 0,78 μg β-Carotin, so daß unter normalen Umständen keine Störung durch D hervorgerufen werden kann. K. Söllner.

Vitamine. *Einfache Methoden zur Auswertung mikrobiologischer Bestimmungen* beschreibt G. Marten[4]. Die Wuchsstoffwirkung wird bei diesen Verfahren als Er-

[1] J. Assoc. off. agric. Chemists **37**, 509—518 (1954). Dptm. Agricult., Albany, Calif.

[2] Analyst (London) **79**, 507—509 (1954). Univ. Cambridge (England).

[3] Beauchene, R. E., H. L. Mitchell, D. B. Parish u. R. E. Silker: J. Agric. Food Chem. **1**, 461 (1953).

[4] Pharmazie **9**, 495—498 (1954). Inst. Vitaminforsch., Potsdam-Rehbrücke.

trag an Mikroorganismen gravimetrisch und turbidimetrisch oder an Hand der gebildeten Stoffwechselprodukte gemessen. Nach dem funktionellen Zusammenhang zwischen Dosis und Ertrag sind zu unterscheiden Verfahren, bei denen der Ertrag proportional dem Logarithmus der Dosis (log ratio-Test) und Methoden, bei denen der Ertrag über einen großen Bereich direkt proportional den verabreichten Vitaminmengen (slope ratio-Test) ist. Im ersten Falle stellt die Ertragskurve nur bei Wahl eines logarithmischen Maßstabes eine Gerade dar. Für die Standardkurve sollen die Dosen in geometrischer Reihe ansteigen. Die unbekannte Dosis läßt sich dann aus dem Abstand parallel zur x-Achse zwischen den beiden Geraden berechnen. Weiterhin kann auch zu deren Ermittlung die gemeinsame Steigung der Geraden und das Mittel aller Erträge des Standards und der unbekannten Substanz herangezogen werden. Bei den meisten mikrobiologischen Methoden ist der Ertrag eine lineare Funktion der Dosis, so daß bei der Aufstellung der Eichkurve zweckmäßig die anzuwendenden Dosen eine arithmetische Reihe bilden. Jede Methode wird an geeigneten Beispielen ausführlich erläutert. Für ein eingehenderes Studium wird auf P. György, „Vitamin Methods", Bd. 2, Acad. Press Inc., New York 1951, verwiesen.

Eine chromatographische Schnellmethode zur Bestimmung von Vitamin A in Leberölen von Walen ist von J. Green und D. O. Singleton[1] angegeben worden. Sie beruht auf der Beobachtung, daß an Floridinerde, die mit Ammoniak neutralisiert worden ist, Vitamin A quantitativ adsorbiert wird und durch Elution von störenden Substanzen abgetrennt werden kann. *Arbeitsvorschrift ohne Verseifung.* Man füllt Floridinerde in ein Chromatographierrohr (15 cm lang, 1,3 cm Durchmesser) über einen Glaswollpfropfen bis zu 3 cm Höhe ein und setzt das Rohr auf eine etwas Ammoniak (D 0,880) enthaltende Saugflasche auf. Man verbindet das obere Ende des Rohres mit einer Pumpe und saugt ein Gemisch von Luft und Ammoniak durch. Nach 2—3 min gibt man den Inhalt des Rohres in ein Becherglas, legt auf den Glaswollpfropfen ein kleines Papierfilter und füllt das Adsorptionsmittel wieder ein. Man läßt nun 25 ml n-Hexan in 5 ml-Portionen durch die Säule laufen und verwirft das Filtrat. Man wechselt das Auffanggefäß und gibt 5 ml der Lösung des Walleberöles in Hexan, 500—800 iE Vitamin A enthaltend, auf die Säule. Man eluiert mit 30 ml n-Hexan und füllt das Eluat mit dem gleichen Lösungsmittel auf 50 ml auf. Man dampft einen aliquoten Teil dieser Lösung unter Beachtung der üblichen Vorsichtsmaßnahmen zur Trockne, nimmt den Rückstand mit Cyclohexan auf und bestimmt den Vitamin A-Gehalt mit einem Spektrophotometer. — Bei Gegenwart nennenswerter Mengen von Anhydrovitamin A ist eine *Verseifung* notwendig. Man geht dann folgendermaßen vor: Man verseift 0,5—1,0 g Walleberöl und löst die unverseifbare Fraktion in n-Hexan. Floridinerde in einer Menge, die einer Säule von 3 cm entspricht, wird mit 10 ml einer 5%igen Lösung von Ammoniak (D 0,880) in Äthanol behandelt. Dann gießt man die Suspension in ein Chromatographierrohr von der oben angegebenen Größe, wäscht die Säule mit 5mal 5 ml Hexan und verwirft das Filtrat. Nach Wechseln der Vorlage gibt man 5 ml der Lösung des Unverseifbaren auf die Säule. Mit 5mal 5 ml n-Hexan wird das Anhydrovitamin A herausgewaschen. Darauf eluiert man mit 6mal 5 ml einer Mischung von 80% Benzol und 20% n-Hexan und fängt in einer besonderen Vorlage auf. Man füllt dieses das Vitamin A enthaltende Eluat zu 50 ml auf und verfährt weiter, wie oben angegeben. Das Verfahren ist nur für Walleberöl geeignet.

Die colorimetrische Vitamin A-Bestimmung in Margarine nach dem Carr-Price-Verfahren ist von A. Schillinger und K. E. Schulte[2] eingehend studiert

[1] Analyst (London) **79**, 431—434 (1954). Walton Oaks Experim. Station, Vitamins Ltd., Tadworth, Surrey (England).

[2] Fette u. Seifen **55**, 603—607 (1953). D. Forsch.-Anst. Lebensmittelch., München.

worden. Zur weitgehenden Ausschaltung des durch Fremdstoffe bedingten Fehlers wird die Anwendung des von E. E. Rice, E. Primm und A. A. Coombes[1] angegebenen und des in den „Methods of Vitamin Assay" der „Association of Vitamin Chemists" beschriebenen Zusatzverfahrens für geeignet gehalten, bei der man nach dem Prinzip des inneren Standards arbeitet, also jeweils noch eine zweite Bestimmung unter Zusatz einer bekannten Menge an Vitamin A durchführt. Dabei werden gleichzeitig die im Gange des Verfahrens unvermeidlichen Verluste berücksichtigt, da die Berechnung von ursprünglich vorhandenem Vitamin A von der Differenz der Extinktionen ausgeht, die der zugesetzten Menge an Vitamin A entspricht. Zur Auswertung wird ein Spektralphotometer empfohlen (620 mμ). Bei der Verseifung wird die Zufügung eines Antioxydanses (Hydrochinon) oder das Arbeiten unter Stickstoff für zweckmäßig gehalten. Die Abtrennung von Vitamin A aus der Seifenlösung erfolgt am besten nach Verreiben mit Aluminiumoxyd mit Hilfe von Äther. Beim Abdestillieren des Äthers soll sich zur Entfernung des vorhandenen Wassers die Zugabe von kleinen Mengen Alkohol bewähren. Zur Entfernung von Stoffen, welche die $SbCl_3$-Reaktion stören, ist die Chromatographie unerläßlich und zwar an einer Mischung aus neutralem Aluminiumoxyd (mit 2% Wasser) und alkalischem Aluminiumoxyd (mit 6% Wasser). Bei der Elution wird nach H. Moor[2] verfahren, wobei der größere Teil des β-Carotins mit Petroläther abgetrennt wird. Durch die sich anschließende Elution mit einem Äther-Petroläthergemisch (15 : 85) wird mit dem gesamten Vitamin A-Alkohol auch das restliche β-Carotin ausgewaschen, dessen Menge aber dann die spätere Messung nicht mehr stört.

Die spektrophotometrishe Methode der Vitamin A-Bestimmung von Morton und Stubbs[3], die auf der Korrektur von bei 3 verschiedenen Wellenlängen bestimmten Extinktionen beruht, ist als offizielle Methode in die U.S. Pharmacopeia XIV und von der Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.) übernommen worden. Im Hinblick auf die verschiedentlich an dieser Methode geübte Kritik haben T. K. Murray und J. A. Campbell[4] die Ergebnisse dieser Methode mit denjenigen aus verschiedenen andern Methoden verglichen. Die mit dem Verfahren von Morton und Stubbs ermittelten Vitamin A-Werte stimmten mit den Ergebnissen der biologischen Methode (Vaginalabstrichtest) besser überein als mit den nach der $SbCl_3$-Methode und nach der unkorrigierten spektrophotometrischen Methode gewonnenen Werten. Auch bei teilweise oxydierten Kabeljauleberölen gab die Korrektionsmethode am besten den biologischen Wert wieder. Bei Heilbuttenleberölen errechneten sich nach diesem Verfahren aus dem Öl die gleichen Werte wie aus dem Unverseifbaren. Bei Kabeljauleberölen wurden allerdings aus dem Öl selbst höhere Werte erhalten. Verff. schließen aus der Tatsache, daß aus dem Unverseifbaren gelegentlich niedrigere Werte gefunden werden als aus den Ölen selbst, nicht wie manche Kritiker des Verfahrens, daß daran eine Überkorrektur schuld sei, sondern daß noch irgendein unbekannter Faktor existiere, der entweder die chemische oder die mikrobiologische Methode beeinflusse.

Zur Trennung und Bestimmung von Vitamin A neben störenden Substanzen ohne Vitamin A-Wirksamkeit in Fischleberölen sind von A. Fujita und M. Aoyama[5] zwei Methoden angegeben worden. Die *indirekte Methode* beruht auf der chromatogra-

[1] J. Assoc. off. agric. Chemists **31**, 621 (1948).

[2] Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. (Bern) **44**, 257 (1953); vgl. diese Z. **141**, 216 (1954).

[3] Analyst (London) **71**, 348 (1946).

[4] J. Pharmacy Pharmacol. **5**, 596—607 (1953). Dept. Nation. Health a. Welfare, Ottawa (Canada).

[5] J. Biochemistry (Tokyo) **40**,157—168 (1953). Kitasato-Inst., Tokyo (Japan).

phischen Trennung des Vitamins A von den Nicht-Vitamin-A-Fraktionen des Unverseifbaren. Dazu wird das zu untersuchende Fischleberöl (10 mg) vorsichtig verseift (30 min bei 75° C mittels 5%iger alkoholischer Kalilauge in H_2-Atmosphäre). Ein Teil der benzolischen Lösung des Unverseifbaren wird der fluorimetrischen Vitamin A-Bestimmung unterworfen und die dabei gemessene Fluorescenz in Vitamin A-Einheiten berechnet. Ein anderer Teil der Lösung des Unverseifbaren wird nach Eindampfen im Vakuum mit Petroleumbenzin aufgenommen, an schwach aktiviertem Al_2O_3 chromatographiert und die Säule mit 10%igem acetonhaltigem Petroleumbenzin entwickelt. Aus der Säule wird die das Vitamin A enthaltende Fraktion herausgeschnitten. Der andere Teil der Säule (das Nicht-Vitamin A enthaltend) wird mit Benzin und dann mit Methanol extrahiert. Der gesammelte Extrakt wird mit Wasser gewaschen und schließlich die Benzinschicht abgetrennt. Die Fluorescenz der in benzolische Lösung übergeführten, Vitamin A vortäuschenden Substanzen wird gemessen und auf Vitamin A umgerechnet. Die Differenz der beiden Werte entspricht dem tatsächlichen Gehalt an Vitamin A. – Bei der *direkten Methode* wird die Lösung des Unverseifbaren in Benzin an schwach aktiviertem Al_2O_3 chromatographiert. Dabei ist allerdings die Trennung von Vitamin D nicht vollständig, was aber bei der fluorimetrischen Bestimmung nicht stört, dagegen gelingt die Trennung von Kitol. Das auf der Säule festgehaltene Vitamin A wird mit Benzol eluiert. Die Bestimmung erfolgt dann fluorimetrisch oder mit Hilfe der $SbCl_3$-Methode. L. Acker.

Für die Bestimmung von Vitamin A in Gegenwart von Tocopherol eignet sich die chromatographische Abtrennung an Aluminiumoxyd. D. T. Ewing, L. A. Sharpe und O. D. Bird[1] erhielten bei eingehenden Untersuchungen des Verfahrens im wesentlichen folgende Ergebnisse: Das Vitamin A-Tocopherolgemisch wird zunächst verseift, indem man die nicht mehr als 0,66 g Öl enthaltende Probe ½ Std mit 20 ml 95%igem Alkohol und 2 ml 50%iger Kalilauge am Rückflußkühler kocht und dann rasch abkühlt. Man versetzt nun mit 40 ml Wasser und schüttelt 3 mal mit 30 ml-Portionen von Hexan aus. Die vereinigten Extrakte werden mit Wasser gewaschen, mit 5–10 g wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und mit Hexan auf 200 ml aufgefüllt. Als Adsorptionsmittel für die Chromatographie eignet sich am besten ein nicht zu aktives Aluminiumoxyd, das erhalten wird, indem man das hochaktive Oxyd etwa 10 Std an der Laboratoriumsluft liegen läßt oder etwa 48 Std in einem Exsiccator über einem Gemisch von 60 Gew% Schwefelsäure und 40 Gew% Wasser aufbewahrt. Man füllt das Chromatographierrohr (12 cm lang, 0,7 cm ⌀) mit Hexan, trägt 2,5 g Adsorbent ein, läßt absetzen, saugt das Hexan ab, bis es 1 cm über der Adsorbentoberfläche steht und bringt dann die zu untersuchende Lösung auf. Als bestgeeigneter Entwickler erwies sich ein Gemisch von Äther und Hexan (1:2). Eluiert wird mit 99%igem Isopropanol. Die Eluate werden in 25 ml-Meßkölbchen aufgefangen, mit Hexan auf 5 ml verdünnt und dann mit Isopropanol zur Marke aufgefüllt. Man mißt die Extinktion der Vitamin A-Fraktionen bei 325 mμ, der Vitamin E-Fraktionen bei 290 mμ. Der Vitamin A-Wert wird nach Morton-Stubbs[2] korrigiert. In den durchgeführten Versuchen wurde das angewandte reine Vitamin A im Mittel zu 94,4% wiedergefunden. Gute Ergebnisse wurden auch mit Gemischen von reinem Vitamin A oder natürlichen Vitamin A-Estern mit α-Tocopherol erzielt, dagegen versagt das Verfahren bei Gemischen, die viel Nicht-α-Tocopherole enthalten (Type IV-Tocopherolmischungen von Parke, Davis & C.). E. Baertich.

[1] Analyt. Chemistry **25**, 599–604 (1953). Michigan State College, East Lansing, Mich., und Parke, Davis & Co., Detroit. Mich. (USA).

[2] Vgl. diese Z. **132**, 228 (1951); **139**, 397 (1953).

Die Bestimmung der B-Vitamine mit Hilfe mikrobiologischer Methoden empfiehlt H. Pritchard[1], da diese im Verhältnis zu den chemischen Methoden wesentlich empfindlicher sind und eine Bestimmung noch in geringsten Konzentrationen ermöglichen. Die Vitamine brauchen nur wenig gereinigt zu werden, da die verwendeten Mikroorganismen außerordentlich selektiv sind. Unter geeigneten Bedingungen gelingt es, ein bestimmtes Vitamin nachzuweisen und außerdem zwischen biologisch aktiven und inaktiven Formen zu unterscheiden. Im Original sind die für die verschiedenen Verbindungen geeigneten Mikroorganismen und die Art der Testung angegeben. Es ist zu diesen Versuchen notwendig, eine Reihe von Chemikalien in der nötigen Reinheit zur Verfügung zu haben, wofür von dem Verf. eine Liste aufgestellt wird.

Die mikrobiologische Bestimmung von Thiamin wurde von dem Analytical Methods Committee[2] untersucht und besonders zwei Verfahren mit einigen Abänderungen empfohlen. Es handelt sich um die Methoden von A. Jones und S. Morris[3] und von E. E. Fitzgerald und E. B. Hughes[4]. Es wird der Lactobacillus fermenti 36 gebraucht. In dem einen Falle handelt es sich um eine Plattenkultur, im anderen Falle um eine Reagensglasmethode. Es wird betont, daß in der Hand von Analytikern ohne mikrobiologische Erfahrungen leicht Fehler unterlaufen können. Die Methode muß auch im kleinsten Detail entsprechend der Vorschrift durchgeführt werden. Eine enzymatische Verdauung des Untersuchungsmaterials, um gebundenes Thiamin abzuspalten, wie z. B. in Weizenkeimen, führt zu keinen quantitativen Ausbeuten, wenn nicht vorher eine Säurehydrolyse stattgefunden hat. Die Plattenmethode ist bei Mengen unter 10 μg nicht zu empfehlen. Bei der Plattenmethode sollen immer 5 Platten gleichzeitig angesetzt werden, auch wenn nur eine Probe untersucht werden soll. Der Durchmesser der Löcher beträgt 10 mm. Sie liegen auf einem Kreis von 26 bzw. 30 mm Radius. Ein Loch dient zur Aufnahme einer Standardlösung mit 0,25 μg Thiamin/ml, die höheren Konzentrationen kommen in die Löcher des inneren Kreises. Der Durchmesser der Wirkungszone muß auf 0,25 mm und nicht auf 0,5 mm, wie in der Originalvorschrift angegeben wird, ausgemessen werden. Für die Reagensglasmethode ist eine sehr peinliche Reinigung mit verdünnter Sodalösung, Salzsäure und Wasser unter Druck notwendig. Alle Glaswaren sollen über Nacht in Chromschwefelsäure stehen. Die Thiaminlösung wird aus einer Stammlösung (100 μg ml) in 0,5 n Salzsäure unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Ein Vergleich mit den beiden Methoden ergibt im allgemeinen für die Reagensglasmethode etwas höhere Werte. Für Vegetabilien liegt der Fehler bei 8—15%. Für Vitamintabletten mit einem wesentlich höheren Gehalt an Thiamin beträgt der Fehler 4,5—9%. K. Hinsberg.

A. Jones[5] gibt zur *Bestimmung der Vitamine der B-Gruppe mit Hilfe von Plattenkulturen in Hefe- und Hefeerzeugnissen* einige verbessernde Vorschläge[3]. So empfiehlt Verf. die Verwendung von jeweils zwei Platten für die Probe- und die Vergleichslösung an Stelle von vier oder fünf. Zur Bestimmung von Riboflavin in Vitamintabletten und in Hefeextrakten wird zu 20 ml Grundlösung 1 ml Impflösung (Suspension von Lactobacillus helveticus, entsprechend der Röhre 5 der Wellcome Standardserie) zugegeben. In einer Tabelle werden die Konzentrationen der Grund-

[1] Analyst (London) **78**, 460—466 (1953). Birkenhead, Ches. (England).

[2] Analyst (London) **79**, 118—121 (1954). Analytical Methods Committee.

[3] Analyst (London) **74**, 333 (1949); **75**, 608, 613 (1950); **76**, 588 (1951); **78**, 15 (1953).

[4] Analyst (London) **74**, 340 (1949).

[5] Analyst (London) **79**, 586 (1954). Beecham Res. Lab. Ltd., Brockham Park, Betchworth, Surrey (England).

lösungen angegeben, ferner wird über die Genauigkeit der Bestimmung sowohl für die einzelnen Vitamine, als auch für den Durchschnitt mehrerer Vitamine berichtet.

Doris Heiligmann.

Eine einfache Thiaminbestimmung in Blut nach J. D. Jansen und G. J. E. Thysse[1] geht von 0,2 ml Blut aus und verwendet eine Mutante von Escherichia coli, die auf Thiamin, Thiaminpyrophosphat und eine Kombination aus der Thiazol- und der Pyrimidinhalfte des Thiaminmoleküls in gleicher Weise anspricht. – *Arbeitsvorschrift.* Die Eichkurve wird mit Konzentrationen zwischen 0,07 mμg und 1 mμg/ml bei 6 ml Gesamtvolumen aufgestellt. Die Nährlösung enthält vitaminfreies Caseinhydrolysat, Phosphatpuffer, Glucose und einige anorganische Salze. Es wird bei 32° C wenigstens 20 Std bebrütet und dann die Dichte der Suspension turbidimetrisch gemessen. Die Kulturen werden auf Peptonagar geführt, das einen großen Überschuß an Thiamin enthält. Das Impfgut wird am Abend zuvor in Peptonwasser und einem Überschuß an Thiamin bereitet. Am nächsten Morgen wird zweimal zentrifugiert. Darnach werden 2 ml der ungefähr auf die ursprüngliche Dichte gebrachten Suspension zu 100 ml einer sterilen Lösung von 0,1% Glucose, 0,8% Natriumchlorid und 0,1% Ammoniumsulfat gebracht. Bei 5stündigem Bebrüten dieser Mischung bei 36° C ist noch etwas Wachstum zu beobachten, hervorgerufen durch geringe Thiaminreserven in den Zellen. Nach 5 Std sind diese aber aufgezehrt, so daß dann die Suspension zum Überimpfen geeignet ist. — 0,2 ml Blut werden in 8,8 ml Wasser suspendiert und bis zur vollständigen Hämolyse (10 min) stehen gelassen. Dazu gibt man 1 ml einer frisch bereiteten 3%igen Metaphosphorsäurelösung, wodurch der p_H-Wert auf etwa 3 erniedrigt wird. Man erhitzt $1^1/_2$ min im siedenden Wasserbad, zentrifugiert und erwärmt nochmals 45 min im Wasserbad, um den Überschuß an Metaphosphorsäure in Orthophosphorsäure umzusetzen. Danach wird der Extrakt auf p_H 6,8 eingestellt und ohne Verdünnung den Kulturröhrchen zugefügt.

L. Acker.

Zur Bestimmung von Vitamin B_1 in Schokoladendragees empfehlen W. Göpfert und P. Huppertz[2] eine colorimetrische Bestimmung mit dem Elko II. Die Methode beruht auf dem Azotest nach McCollum und Prebluda[3]. — *Arbeitsweise.* 10 g Dragees werden in einem Becherglas 3mal mit je 30 ml Wasser behandelt und die so erhaltenen Zuckerlösungen auf 250 ml verdünnt. (Um Störungen und Vitaminverluste, die durch Filtrieren auftreten, zu vermeiden, sollte die Lösung auch bei einer eventuellen Trübung unfiltriert weiterverarbeitet werden.) Zu einer Mischung, bestehend aus 2 ml gekühlter alkalischer Lösung (2 g Natriumhydroxyd und 2,9 g Natriumhydrogencarbonat werden in 100 ml Wasser gelöst) und aus 2 ml Diazoreagens (0,6 g p-Aminoacetophenon [Merck] werden in 9 ml 36%iger Salzsäure gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. 1,5 ml dieser Lösung werden in einem 50 ml-Meßkolben auf 0—5° C abgekühlt und 1,5 ml auf 0—5° C gekühlte 4,4%ige Natriumnitritlösung zugegeben. Nach 10 min langem Stehen gibt man weitere 6 ml Nitritlösung zu und nach abermals 10 min wird mit Eiswasser auf 50 ml aufgefüllt. Nach 15 min ist dieses Diazoreagens verwendbar; es sollte bei 0° C aufbewahrt und jeden Tag frisch bereitet werden), gibt man in einem zylindrischen Scheidetrichter genau 1 min nach Herstellung der Mischung 2,5 ml der Zuckerlösung (= 0,1 g Einwaage) und 10 ml 60%igen Alkohol zu. Nach 20 min fügt man noch 5 ml Xylol zu und läßt unter öfterem Schütteln 1 Std stehen. Nach Ablassen

[1] Chem. Weekbl. **50**, 18 (1954) [Holländisch]. Univ. und Nederl. Inst. Volksvoeding, Amsterdam.

[2] Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. **50**, 120—121 (1954).

[3] Literaturnachweis siehe Gstirner: Chemisch-Physikalische Vitaminbestimmungsmethoden, 4. Aufl., 104.

der unteren Schicht wäscht man das Xylol mit 10 ml 0,5 n Salzsäure, trennt das Xylol ab und trocknet über Natriumsulfat. Die Farbintensität des roten Azofarbstoffes wird in einer 10 mm-Küvette mit Filter S 53 im Elko II (Zeiß) gegen Xylol als Vergleichsflüssigkeit gemessen. Zur Aufstellung einer Eichkurve kommen jeweils 2 ml von Standardlösungen, die 10 – 60 μg Aneurin, rein (Merck), in wäßriger Lösung enthalten, zur Anwendung. In einer Tabelle geben Verff. die dabei erhaltenen Extinktionen an. Doris Heiligmann.

Die Trennung von Vitamin B_1 und Cholin gelingt nach A. Heyndrickx[1] auf chromatographischem Wege unter Benutzung der von W. H. Stein und S. Moore[2] für die Trennung der Aminosäuren angegebenen Arbeitsweise. Der Verf. benutzt schmale (40 cm Länge, 0,9 cm ⌀) und breite (20 cm Länge, 1,9 cm ⌀) Chromatographierrohre. Die als Adsorptionsmittel dienende Stärke wird bei 110° C zur Gewichtskonstanz getrocknet, dann mit n-Butanol und 30% ihres Gewichtes an Wasser zu einer Suspension gerührt, in das Rohr gefüllt und mit dem Lösungsmittel [n-Propylalkohol + 0,1 n Salzsäure (2 : 1)] durchgewaschen. Das Cholin-Thiamingemisch wird mit dem Lösungsmittel extrahiert und die Lösung chromatographiert. Die Identifizierung der Bestandteile erfolgt in Tropfen des Eluats, die man auf Filterpapier eintrocknet. Zum Nachweis von *Cholin* besprüht man mit einer frisch bereiteten, 1%igen wäßrigen Lösung von Kaliumcyanoferrat(II) und dann mit einer 0,5%igen wäßrigen $CoCl_2$-Lösung. *Cholin* gibt in wenigen Sekunden einen grüngefärbten Ring (Empfindlichkeit 10 μg). Zum Nachweis von *Thiamin* besprüht man einen weiteren Tropfen des Eluats auf Papier mit 2 n Natronlauge, die 5% Kaliumcyanoferrat(III) enthält. 0,5 μg Thiamin ist noch an der grünen Fluorescenz im UV-Licht zu erkennen. Zur quantitativen Bestimmung fängt man die Eluate in 2 ml-Portionen auf (in der Nähe des Trennungspunktes in 0,5 ml-Portionen). In Proben, die 500 mg Cholin und 0,1 mg Thiamin enthielten, wichen die Ergebnisse für Cholin um höchstens 3%, für Thiamin um 5% von den wahren Gehalten ab. E. Baertich.

Zur Bestimmung des Vitamin-B_1-Gehalts von Hefen benutzen G. Butschek, G. Krause und W. Rosskopf[3] die Fermentmethode von A. Schultz, L. Atkin und C. Frey[4], die auf der Beschleunigung der alkoholischen Gärung der Hefe durch Vitamin B_1 beruht. Verff. empfehlen, die Ergebnisse nicht rechnerisch[5], sondern graphisch auszuwerten, da die Eichpunkte nur selten auf einer Geraden liegen. Die Arbeit enthält neben einer ausführlichen Beschreibung der Methode auch Literaturangaben über den Gehalt verschiedener Hefen an Vitamin B_1 sowie Hinweise über dessen Beeinflussung durch Züchtung. H. Sperlich.

Zur spezifischen Bestimmung von Vitamin B_6 in Arzneimittelzubereitungen eignet sich nach L. Szabolcs[6] die Bromierung in salzsaurer Lösung, die infolge Anwesen-

[1] J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. **42**, 315—316 (1953). Univ. Minneapolis, Minn. (USA).

[2] J. biol. Chemistry **176**, 337 (1948); **178**, 53 (1949); vgl. diese Z. **136**, 438 (1952).

[3] Z. Lebensmittel-Unters. u.-Forsch. **98**, 89—105 (1954). Zellstoff-Fabrik Waldhof, Werk Kostheim/Main.

[4] J. Amer. chem. Soc. **54**, 211 (1932); **59**, 948, 2457 (1937); **60**, 1514, 3084 (1938); **63**, 362 (1941); Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **14**, 35 (1942); vgl diese Z. **117**, 291 (1939). — Heyns, K.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **258**, 219 (1939).

[5] Methods of vitamin assay. Assoc. of vitamin chemists inc., Chicago, Ill., New York, Interscience Publ. Inc. 1947.

[6] Magyar Kémiai Folyóirat **59**, 218—220 (1953) [Ungarisch]. Hygien. Inst. Budapest.

heit der phenolischen Hydroxylgruppe glatt erfolgt. Wenn man im Dunkeln arbeitet, stören andere Vitamine der B-Gruppe (Aneurin oder Lactoflavin) nicht. Im Tageslicht entständen aus diesen störende Zersetzungsprodukte. — *Ausführung.* Man löst 0,02 g Pyridoxinhydrochlorid oder eine entsprechende Menge der zu prüfenden Tablette in 150 ml Wasser, fügt 20 ml 0,1 n $KBrO_3$-Lösung und 0,2 g KBr zu, säuert mit 10 ml 15%iger Salzsäure an, läßt 45 min stehen, setzt 0,2 g Kaliumjodid zu und titriert nach 5 min mit 0,1 n Thiosulfatlösung. J. Plank.

Eine chemische Methode zur Bestimmung von Vitamin B_{12} in Leberextrakten beschreibt A. Gaudiano[1]. — *Ausführung.* Die Lösung des Leberextraktes mit etwa 100 μg Vitamin B_{12} versetzt man mit etwa 0,1% festem Kaliumcyanid, stellt auf p_H 6 – 6,5 ein, läßt über Nacht bei Raumtemperatur oder 3 Std bei 52° C vor Licht geschützt stehen, extrahiert dann mit dem halben Volumen n-Butanol, entfernt die alkoholische Schicht, sättigt die wäßrige Lösung mit Ammoniumsulfat (etwa 0,8 g ml) und extrahiert dreimal mit jeweils einem Fünftel des Volumens der wäßrigen Lösungen an n- oder Isobutanol. Die vereinigten alkoholischen Extrakte wäscht man mit dem halben Volumen an gesättigter Ammoniumsulfatlösung und extrahiert dreimal mit einem Fünftel des Volumens an Wasser, versetzt die wäßrigen Extrakte mit der gleichen Menge konz. Salpetersäure (D 1,40), dampft auf dem siedenden Wasserbade ein, verascht den Trockenrückstand vorsichtig auf direkter Flamme und erhitzt 1 Std im Ofen bei 600° C. Nach dem Auskühlen löst man den Rückstand in etwas Salpetersäure (1 : 1), dampft wieder ein und verascht nochmals 5 min lang bei 500° C und wiederholt dies bis zur völligen Verbrennung. Den letzten Rückstand löst man in 10 ml etwa 6 n Salzsäure, dampft auf dem Wasserbad zur Trockne ein, nimmt mit 10 ml Salzsäure (1 : 1) auf und dampft erneut zur Trockne ein. Nun fügt man 3 ml 10%ige Natriumcitratlösung zu, erwärmt einige Sekunden auf dem Wasserbad und überträgt die Lösung in ein Reagensglas mit Schliffstopfen. Den Tiegel spült man erst mit 2 ml und dann mit 1 ml Citratlösung nach und fügt 0,2 ml der 1%igen α-Nitroso-β-naphthollösung in 50%iger Essigsäure zu. Man schüttelt und versetzt nach 1 min mit 6 ml Chloroform. Nach 1 min starkem Schütteln entnimmt man die obere Schicht, wäscht die Chloroformlösung dreimal mit 5 ml konz. Salzsäure, dann mit 10 ml Wasser, ferner dreimal mit 5 ml 5%iger Natronlauge und schließlich mit 10 ml Wasser. Nach Entwässerung mit Natriumsulfat mißt man die Extinktion bei 402 mμ im Beckman-Spektrophotometer in 1 cm-Küvette. Bezugslösung kann Chloroform oder besser eine Blindlösung sein. Der Extinktionswert, mit 10 multipliziert, gibt den Kobaltgehalt in Mikrogramm in der Lösung in Form von Cobalamin an. Da Vitamin B_{12} 4% Kobalt enthält, läßt sich dessen Menge leicht errechnen. H. Freytag.

In kritischen Bemerkungen zu den Bestimmungsmethoden für Vitamin B_{12} teilt H. C. Heinrich[2] mit, daß für die chemischen Methoden bisher noch nicht der Beweis erbracht worden sei, daß in jedem Falle die chemisch bestimmte Menge an Kobalamin mit dem Gehalt an biologisch wirksamem Vitamin übereinstimmt. Die chemischen Methoden erfassen eine Reihe verwandter, aber biologisch unwirksamer Stoffe. Sie sind daher nur für reine Vitaminlösungen geeignet. Die biologischen Teste am Wirbeltier (Wachstumstest an Ratten, Mäusen, Küken oder Schweinen) sind zeitraubend, langwierig und unspezifisch. Bei den mikrobiologischen Methoden sind die Einflüsse von anderen Stoffen wie Desoxyriboside der Purin- und Pyrimidinbasen, Desoxy- und Ribonucleinsäuren, Porphyrine, verschiedene Peptide auf das Wachstum von Lactobacillus Dorner und Lactobacillus Leichmannii zu berück-

[1] Boll. Soc. ital. Biol. sperim. **29**, 471—473 (1953). Ist. Super. di Sanità, Rom.
[2] Dtsch. tierärztl. Wschr. **1954**, 93—97. Univ. Hamburg.

sichtigen. Auch der Sauerstoffpartialdruck, die Konzentration der Salze, Veränderungen beim Autoklavieren können sich auswirken. Verf. kommt daher zu dem Schluß, daß beide Lactobacillen für eine spezifische Vitamin B_{12}-Bestimmung ungeeignet sind. Auch der Test mit der Escherichia coli-Mutante 113-3 ist unspezifisch. Die exakteste Methode stellt der Wachstumstest mit der Phytoflagellate Euglena gracilis var. bacillaris dar. Im biologischen Material und in Handelspräparaten konnten bisher noch keine Substanzen gefunden werden, welche diesen Test gestört hätten. Es kommt daher nur diese Methode zur Beurteilung des Vitamin B_{12}-Gehaltes in B_{12}-Handelspräparaten in Betracht. L. Acker.

M. J. Beck[1] beschreibt *die mikrobiologische Bestimmung von Vitamin B_{12} in Leberextrakten unter Ausschaltung anderer, das Bakterienwachstum beeinflussender Faktoren.* Als Testorganismen dienen verschiedene Stämme von Lactobacillus Leichmannii, deren Wachstumsbeschleunigung mit bekanntem B_{12}-Gehalt festgestellt wird. Nun wird B_{12}-freien Nährlösungen der zu testende Leberextrakt zugesetzt und dessen stimulierende Wirkung festgestellt. In weiteren Versuchsserien wird der gleiche Extrakt nach Hydrolyse mit Säure, in dem also B_{12} zerstört wurde, sowie dasselbe Material mit Zusatz bekannter Mengen B_{12} untersucht. Schließlich wird der Extrakt einer alkalischen Hydrolyse unterworfen, wobei unter Erhaltung des B_{12} die übrigen wachstumsfördernden Faktoren wie Purine, Peptide und Pyrimidine ausgeschaltet werden. Durch Vergleich der bei den verschiedenen Untersuchungsreihen ermittelten Befunde wird die Eliminierung aller übrigen stimulierenden Komponenten ermöglicht und damit der Gehalt des Leberextraktes an reinem B_{12} bestimmbar. Die Untersuchungsmethodik ist in dem mit Diagrammen und Tabellen ausgestatteten Original ausführlich beschrieben. K. Söllner.

Ein Bestimmungsverfahren für Vitamin B_{12} in Streptomyces-Kulturflüssigkeiten gibt F. Patte[2] an[3]. Durch Verwendung eines mit KCN imprägnierten Papiers in einer mit HCN beladenen Luft gelingt es, störende begleitende Antibiotica auszuschließen. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt dann über einem Kulturboden von Escherichia coli mittels wäßrigen Isopropanols. Da sich ferner zeigte, daß der Durchmesser der erzeugten Flecken ziemlich genau der Konzentration an Cobalaminen entspricht, kann man den gesuchten Gehalt ermitteln, indem man zum Vergleich Flecken von Tropfen mit geometrisch steigendem Gehalt bekannter μg-Mengen von Vitamin B_{12} mißt, deren Durchmesser, der optisch genau ausgemessen wird, in arithmetrischem Sinne anwächst. Sie liegen auf einer geraden Linie. Man kann so in Rohkulturflüssigkeiten den Gehalt an Vitamin B_{12} mit einer Genauigkeit von rund 17% feststellen. — *Verfahren.* Auf einem Filterpapier von 30 × 24,5 cm bringt man im Abstand von 15 cm von einer Langseite entfernt einen Strich mit 9, je 3 cm voneinander entfernt liegenden Marken an. Man taucht das Papier dann 15 min lang in eine 1%ige Kaliumcyanidlösung und läßt es 24 Std zwischen 2 Filtrierbogen an der Luft trocknen. Mittels einer Mikropipette bringt man darauf abwechselnd 0,0025 ml große Tropfen einer bekannten Standardlösung von B_{12} und der zu untersuchenden Lösung auf die vorgesehenen Marken, wobei man von der Vergleichslösung immer um das Doppelte steigende von 0,125—2 μg/ml, sowie 4 im gleichen geometrischen Sinne zunehmende Konzentrationen von der Untersuchungsflüssigkeit anwendet. Nach Verdunsten der Flüssigkeiten rollt man

[1] Ann. pharmac. franç. **12**, 132—145 (1954). L'Industrie Biol. Française.

[2] Ann. pharmac. franç. **11**, 37—44 (1953). Inst. Roussel-Sofrapen, Romainville und Fac. Pharm., Paris.

[3] Vorhergehende Arbeit vgl. F. Patte, Ann. pharmac. franç. **9**, 660 (1951); vgl. diese Z. **138**, 384 (1953).

das Filterpapier zu einem Zylinder zusammen, dessen Enden mit 2 Heftklammern befestigt werden. Die Rolle stellt man sodann in einen Stutzen, der 150 ml 30% Wasser enthaltendes Isopropanol sowie in der Mitte ein Becherchen mit 25 ml 1%iger Kaliumcyanidlösung, gemischt mit 4 ml 50%iger Schwefelsäure, enthält. Die aufgebrachten Tropfen befinden sich also im Abstand von etwa 13,5 cm über der Flüssigkeitsoberfläche. Man verschließt den Stutzen mit Uhrglas und Klebestreifen und beläßt ihn dann 15 Std lang in einem Ofen bei 27° C. Darnach nimmt man das Papier aus dem Stutzen, trocknet es an der Luft und legt es 10 min auf eine Platte, die mit einer Gelatinenährschicht überzogen und mit Escherichia coli beimpft ist. Nach einer Zeit von 18 Std bei 27° C inkubiert findet man, daß die Flecken mit Cobalaminen weitergewandert sind (R_f = 0,75), während die Antibiotica an der Ausgangsstelle zurückgeblieben sind. Man mißt den Durchmesser der ziemlich kreisförmigen B_{12}-Flecken genau aus. Da sich ihre Konzentrationen geometrisch, ihre Durchmesser aber arithmetrisch zueinander verhalten, erfährt man den gesuchten Gehalt durch Vergleich der Linie der bekannten Konzentrationen bzw. der entsprechenden Durchmesser mit den Verhältnissen der Geraden aus der zu prüfenden Lösung. H. Zellner.

Über die colorimetrische Bestimmung von Vitamin C mit 2-Nitro-4-methoxyanilin berichten Y. Kochi und Sh. Kasahara[1]. Man versetzt 5 ml der Vitamin-C-Lösung in 2%iger Metaphosphorsäure (enthaltend 5—22 μg Vitamin C je ml) mit 3 ml Diazoreagens, macht mit 2 ml 10%iger Natronlauge alkalisch und mißt die blauviolette Farbe bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums 570 mμ. ($E^{1\%}_{1\,cm}$ = 447). — *Reagens.* 1 ml einer 0,5%igen salzsauren Lösung von 2-Nitro-4-methoxyanilin wird mit 1 ml 2%iger Natriumnitritlösung versetzt, der Nitritüberschuß mit Ammoniumsulfaminat zerstört und das Volumen mit 2 n Natriumacetatlösung auf 100 ml ergänzt. A. Kurtenacker.

Eine neue colorimetrische Bestimmungsmethode für Ascorbinsäure mittels diazotiertem 4-Methoxy-2-nitranilin teilen M. Schmall, C. W. Pifer und E. G. Wollish[2] mit. — *Arbeitsweise.* Man mischt 2 ml Aminoreagens (500 mg 4-Methoxy-2-nitranilin + 125 ml Eisessig + 125 ml 10%ige Schwefelsäure) mit 2 ml 0,2%iger Natriumnitritlösung und fügt 75 ml Äthanol (oder Isopropanol) und 5 ml der Probe (mit etwa 0,5—2 mg Ascorbinsäure in 0,5%iger Oxalsäurelösung) hinzu. Man mischt, versetzt mit 25 ml 10%iger Natronlauge, füllt auf 200 ml mit Wasser auf, mischt nochmals und photometriert nach 1 min die blaue Farbe bei 570 mμ. Von einer 0,5%ig oxalsauren Standardlösung (0,5 mg Ascorbinsäure/ml) bereitet man zwei Lösungen, A (mit 1 mg Ascorbinsäure) und B (mit 1,5 mg Ascorbinsäure), die man genau so wie die Probe behandelt. Weiterhin benötigt man eine Reagensblindprobe (bereitet wie oben, nur ohne Probelösung) und bei gefärbten Proben eine Blindprobe, die ohne Aminoreagens hergestellt wird. Die Berechnung erfolgt nach folgender Gleichung: mg Ascorbinsäure $= A + [(B - A) \cdot (E - C)/(D - C)]$. Hierin bedeuten A = mg Ascorbinsäure in Standard A; B entsprechend; C = Absorption von Standard A; D entsprechend; E = Absorption der Probe. Reduktionsmittel in den gewöhnlich vorkommenden Konzentrationen stören nicht; ebenso können auch andere Vitamine, sowie Oxydations- und Abbauprodukte der Ascorbinsäure anwesend sein. Brenztraubensäure hingegen liefert eine Rotfärbung. Sind Reduktone und Reduktinsäure vorhanden, so wendet man die Formaldehyd-

[1] J. pharmac. Soc. Japan **74**, 443—446 (1954). [Japanisch]. (Nach engl. Zus.-fass. ref.) National Hygienic Lab., Osaka (Japan).

[2] Analyt. Chemistry **25**, 1486—1490 (1953). Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, N. J. (USA).

Modifikation nach W. B. Robinson und E. Stotz[1] an. — Zur Bestimmung der Ascorbinsäure in *löslichem Kaffeepulver* nimmt man eine Extraktion mit 50 ml einer Lösung von 25 mg Oxalsäure in Äthanol vor und verfährt weiter wie oben. — Bei *stark gefärbten Proben* extrahiert man nach deren Zusatz 3mal mit je 25 ml Benzol, gibt zu den vereinigten Extrakten 25 ml 10%ige Natronlauge, trennt die wäßrige Schicht ab und füllt sie auf 200 ml auf, nachdem man die Benzolschicht noch einige Male mit Wasser gewaschen und dieses hinzugefügt hat. — Die Genauigkeit der Methode entspricht einer maximalen Abweichung vom Mittel von 0,8%. H. Freytag.

Die fluorimetrische Bestimmung von Gesamtvitamin C nach Sh. Ogawa[2] beruht auf der Reaktion von Dehydroascorbinsäure mit o-Phenylendiamin, die bei Raumtemperatur zur Bildung einer fluorescierenden Verbindung führt. Diese Reaktion läßt sich zur fluorimetrischen Bestimmung von Gesamt-Vitamin C auswerten. Eine Lösung von Gesamt-Vitamin C in Metaphosphorsäure oder Metaphosphorsäure-Eisessig wird mit Alkali auf p_H 5 gebracht und mit o-Phenylendiaminlösung versetzt. Die nach einer bestimmten Zeit bei einer bestimmten Temperatur gebildete Fluorescenz wird gemessen und verglichen mit dem Grad der Fluorescenz, die mittels Standard-Vitamin-C-Lösungen erhalten worden war. Um Blindfluorescenz auszuschalten, wird alkalische Behandlung und Entfernung der störenden Substanzen mit Hilfe eines Adsorbenten empfohlen. Die Störung durch Reducton konnte nicht vollständig ausgeschaltet werden, jedoch beträgt der Fehler bei gleichen Mengen Reducton und Ascorbinsäure nur 7%. L. Acker.

Zur Bestimmung von Ascorbinsäure, Dioxymaleinsäure und Reducton nebeneinander, z. B. im Wein, benutzt J. Baraud[3] die von ihm früher[4] untersuchte Tartrazinreaktion. Diese Reaktion beruht darauf, daß Verbindungen, die eine -CO-CO-Gruppierung enthalten, mit p-Sulfophenylhydrazin bei p_H 4,7 beim Erhitzen im siedenden Wasserbade intensiv gelbes Tartrazin bilden, dessen Menge colorimetrisch bestimmt wird. In Vorversuchen ermittelte Verf. die Beständigkeit und Reaktionsfähigkeit einiger Verbindungen ähnlicher Konstitution, die ebenfalls im Wein vorkommen, und zwar der Diketogulonsäure, der Dioxyweinsäure, des Glyoxals, des Diacetyls und der Monosaccharide. Um *Diketogulonsäure* (I) und *Dioxyweinsäure* (II) nebeneinander zu bestimmen, macht man sich die Tatsache zunutze, daß bei p_H 7,4 und normaler Raumtemperatur I mindestens 24 Std beständig ist, wogegen sich II in wenigen Stunden völlig zersetzt. Entnimmt man der auf p_H 7,4 gepufferten Lösung von Zeit zu Zeit Proben und führt mit ihnen die Tartrazinreaktion bei p_H 4,7 und 100° C während 75 min aus, so erhält man bei Messung der Absorption mit der Zeit auf den Wert der Diketogulonsäure abfallende Kurven, bei deren Extrapolation auf die Zeit Null man die Summe von I und II und nach Substraktion von I den Wert der Dioxyweinsäure allein erhält. — *Reducton* läßt sich ebenfalls als Tartrazin bestimmen; im Gegensatz zur Diketogulonsäure ist seine Lösung unterhalb p_H 6,0 auch im siedenden Wasserbad beständig. — *Glyoxal* ist in der Kälte wie in der Siedehitze stabil. Es gibt nur eine schwache Tartrazinreaktion, diese aber im Gegensatz zu den übrigen Verbindungen im p_H-Bereich von 2—7 mit praktisch konstanter Intensität. — Noch schwächer verläuft die Tartrazinreaktion mit *Diacetyl*; das Optimum liegt hier wie bei der Diketogulonsäure bei einem

[1] J. biol. Chemistry **160**, 217 (1945).

[2] J. pharmac. Soc. Japan **73**, 316—323 (1953) [Japanisch] (nach engl. Zus.fass. ref.). Nation. Hyg. Inst.

[3] Bull. Soc. chim. France **1953**, 521—525. Fac. Sci., Bordeaux (Frankreich).

[4] Baraud, J., Bull. Soc. chim. France **1951**, 837; vgl. diese Z. **137**, 63 (1952/53).

p_H-Wert von 4,7, jedoch ist das LAMBERT-BEERsche Gesetz nicht erfüllt. — Mit *Monosacchariden* wird eine Tartrazinbildung nur in sehr hohen Konzentrationen bemerkbar. Eine Beziehung zwischen Farbintensität und Zuckerkonzentration besteht dabei nicht. — Um ein *Gemisch verschiedener Diketoverbindungen* zu analysieren, empfiehlt der Verf. den folgenden Arbeitsgang, bei dem von der unterschiedlichen Beständigkeit der Verbindungen bei verschiedenen Temperaturen und p_H-Werten oder von ihrer Flüchtigkeit mit oder ohne Wasserdampf (Glyoxal, Diacetyl) Gebrauch gemacht wird. Beispielsweise löst man ein Gemisch von je 50 mg Dioxyweinsäure, Ascorbinsäure und Reducton, 250 mg Diacetyl und 2000 mg Glucose in 250 ml 0,4 n Boratpufferlösung vom p_H-Wert 7,5, oxydiert schnell mit Jod, stellt den p_H-Wert auf 7,4 und verdünnt auf 1000 ml. Von Zeit zu Zeit (Messung ab Auflösung in der Pufferlösung) entnimmt man 5 ml Lösung, verdünnt mit 5 ml Wasser, versetzt mit 5 ml frisch bereitetem p-Sulfophenylhydrazinreagens (5 g/l), senkt den p_H-Wert auf 4,6, erhitzt 75 min im siedenden Wasserbad, kühlt, verdünnt auf 20 ml und mißt jedesmal die Absorption bei der Hg-Linie 436 mμ. Ist nach völliger Zerstorung der Dioxyweinsäure die Absorption konstant geworden (Wert = B), so extrapoliert man die Absorption-Zeit-Kurve auf die Zeit Null und erhält den Absorptionswert C. Die Differenz C — B entspricht der *Dioxyweinsäure*. (*B* = Absorption entsprechend Ascorbinsäure + Reducton + Diacetyl + Glucose.) Zur Zerstorung der Ascorbinsäure verdünnt man 5 ml der oben behandelten Lösung mit 5 ml Wasser, erniedrigt den p_H-Wert auf 4,0 und erhitzt 30 min im siedenden Wasserbad. Nach dem Abkühlen führt man auf die bereits beschriebene Weise bei p_H 4,6 die Tartrazinreaktion aus und erhält einen Absorptionswert A, der nur noch der Summe von Reducton, Diacetyl und Glucose entspricht. *B* — *A* = *Ascorbinsäure*. Destilliert man von 50 ml Lösung nach dem Einstellen des p_H-Wertes auf 4,0 langsam 20 ml über, verdünnt das Destillat auf 50 ml und führt mit 5 ml wieder die Tartrazinreaktion durch, so entspricht die Absorption (*D*) dem *Diacetyl*. *A* — *D* = *E* = Reducton + Glucose. Zuletzt bereitet man sich eine frische Lösung von 2 g Glucose im Liter und unterwirft davon 5 ml der Tartrazinreaktion. Absorption = *F*. Die Differenz *E*—*F* entspricht dem *Reducton*. F. NEUMANN.

Für die Bestimmung von Ascorbinsäure in pharmazeutischen Zubereitungen empfiehlt G. WENDLAND[1], an Stelle der TILLMANS'schen Methode mit 2,6-Dichlorphenolindophenol in einer Einwaage nacheinander den Natronlaugeverbrauch und das Reduktionsvermögen gegen Jodlösung zu ermitteln. H. SPERLICH.

Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure bestimmen J. SETNIKAR und M. POIDOMANI[2] nebeneinander, indem sie die erstere zunächst durch Titration mit Methylenblaulösung unter starker Belichtung ermitteln und dann die hierbei entstehende Dehydroascorbinsäure gemeinsam mit der vorhandenen mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin nach der Methode von J. H. ROE und C. A. KUETHER[3] in der Modifikation von K. H. MEYER, C. H. HASELBACH und R. A. BOISSONAS[4] feststellen. — *Arbeitsweise*. Man bringt die zu untersuchende Probe mit 4%iger Trichloressigsäurelösung auf ein Volumen von 3 ml, filtriert und titriert nach E. MARTINI und A. BONSIGNORE[5] mit wäßriger Methylenblaulösung (1 : 10000) unter

[1] Schweiz. Apotheker-Ztg. **91**, 865–866 (1953). Krankh.-Apoth. Heidberg, Hamburg.

[2] Boll. Soc. ital. Biol. sperim. **29**, 549—552 (1953). Univ. Mailand.

[3] J. biol. Chemistry **147**, 399 (1943).

[4] Helv. chim. Acta **35**, 1781 (1952); vgl. diese Z. **140**, 400 (1953).

[5] Boll. Soc. ital. Biol. sperim. **9**, 388 (1934); vgl. auch Biochem. Z. **273**, 170 (1934); vgl. diese Z. **102**, 153 (1935).

Bestrahlung mit einer 500 W-Lampe, deren Licht mit einer Zylinderlinse konzentriert wird. 1 ml der Methylenblaulösung entspricht etwa 50 μg Ascorbinsäure. Der Titer wird an einer Probe mit bekanntem Gehalt gleichzeitig ermittelt. Sodann verfährt man mit der titrierten Lösung nach der MEYER'schen Modifikation. Am günstigsten arbeitet man mit einem Ascorbinsäuregehalt der Probe von 10—30 μg. H. FREYTAG.

Die Bestimmung von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in Gegenwart von Reduktonen haben P. SPANYÁR, JOZSEFNÉ KISZEL und ERVINNÉ DEMEL[1] bearbeitet. Dabei ergab sich, daß das α,α'-Dipyridylverfahren[2] zur Bestimmung der gemeinsamen Reduktionsfähigkeit der Ascorbinsäure und Reduktone sehr geeignet ist. Zur Bestimmung der Reduktone allein benutzt man die Tatsache, daß sich Ascorbinsäure bei p_H 5 und 40° C in 2 Std bis auf etwa 10% zersetzt, während die Reduktone nicht angegriffen werden. — *Ausführung.* Zur *Bestimmung der Gesamtreduktionsfähigkeit* bereitet man aus 5—10 g des zu untersuchenden Nahrungsmittels durch Verreiben mit 2 ml Eisessig und Auffüllen auf 100 ml einen Extrakt und bestimmt darin nach der angegebenen Methode die gesamte Menge der Ascorbinsäure und Reduktone. — Zur *Bestimmung der Reduktone* wird ein 20—250 μg enthaltender Anteil des Extraktes (1—5 ml) mit dem vierfachen Volumen 20%iger Ammoniumacetatlösung versetzt, wodurch der p_H-Wert der Lösung auf 5 ansteigt. Zu der 2 Std auf 40° C gehaltenen Lösung gibt man ebensoviel 1%ige Citronensäurelösung als man Ammoniumacetatlösung zugefügt hatte, dann 2 ml Eisen(III)-salzlösung [0,1% $Fe(NH_4)(SO_4)_2$ in 20%iger Phosphorsäure] und 0,4 ml 1%ige alkoholische α,α'-Dipyridyllösung[2]. Die weitere Bestimmung wird nach SCHULEK durchgeführt, und das Ergebnis auf Ascorbinsäure berechnet. Als Korrektur für die unzersetzt gebliebene Ascorbinsäuremenge zieht man 10% vom Ergebnis ab. — Zur *Bestimmung der Dehydroascorbinsäure* schien die Methode von ROE[3] geeignet, da jedoch in Nahrungsmitteln solche Stoffe vorhanden sind, welche wie die Dehydroascorbinsäure in Schwefelsäure mit roter Farbe lösliche, osazonartige Verbindungen bilden, mußte dem abgeholfen werden. Die Verff. stellten fest, daß die Dehydroascorbinsäure in alkalischer Lösung (p_H = 10,4) binnen 20 min vollständig zersetzt wird und bestimmten deshalb erst die gesamte Menge der störenden Verbindungen und der Dehydroascorbinsäure, zersetzten dann letztere und bestimmten die störenden Verbindungen wie folgt. Von dem oben erwähnten Extrakt versetzt man in einem Reagensglas 0,5 ml mit 1 Tropfen Thioharnstofflösung, ergänzt die Lösung mit 4%iger Trichloressigsäure auf 4 ml und gibt 1 ml 2%ige 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung zu. Nach 3stündigem Stehen bei 37° C kühlt man das Reagensglas mit Eis, tropft 5 ml 90%ige Schwefelsäure vorsichtig zu und photometriert die Lösung. Dann gibt man zu 0,5 ml des Extraktes 0,5 ml n Natronlauge, schüttelt, ergänzt mit Trichloressigsäure auf 4 ml und photometriert nach Zugabe von 1 ml 2%iger 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung. Die Differenz entspricht der Menge der Dehydroascorbinsäure. J. PLANK.

Die Bestimmung von Sulfhydrylstoffen in Früchten hat P. ZUMAN[4] vorgenommen. Es wurden Obstsäfte aus Weichseln, Kirschen, roten, weißen und schwarzen Johannisbeeren, Himbeeren, Stachelbeeren und Tomaten untersucht und *polarographisch* der Ascorbinsäuregehalt sowie der Gehalt an Sulfhydrylverbindungen

[1] Magyar Kémiai Folyóirat **59**, 143—148 (1953) [Ungarisch]. Forsch.-Inst. Konserven- und Fleischindustrie, Budapest.

[2] SCHULEK, E., u. I. FLODERER: Angew. Chem. **52**, 615 (1939).

[3] J. biol. Chemistry **152**, 511 (1944).

[4] Collect. czechoslov. chem. Commun. **16**, 510—525 (1953). Polarograph. Zentr.-Inst., Prag.

bestimmt, deren Summe in der Regel dem auch chemisch analysierbaren Vitamin C-Gehalt entspricht. Der Sulfhydrylgehalt läßt sich daher auch als ein Gehalt an „scheinbarem Vitamin C" auffassen.

Sulfhydrylgruppen enthaltende Verbindungen (Glutathione) sind an der anodischen Welle kenntlich, die 300 mV negativer liegt als die der Ascorbinsäure, wenn der Saft möglichst frisch allein (p_H 3—5) oder mit der gleichen Menge Acetatpufferlösung (p_H 4,7) gemischt, erforderlichenfalls nach Behandeln mit Stickstoff polarographiert und mit Eichaufnahmen an Glutathion verglichen wird, dessen Diffusionskoeffizient dem der Sulfhydrylverbindungen gleichgesetzt wird. Diese Stufe entspricht nach I. M. Kolthoff und C. Barnum[1] der Bildung eines monomeren Quecksilbersalzes und stört die Bestimmung der Ascorbinsäure nicht, wenn — wie D. M. Coulson, W. R. Crowell und S. L. Friess[2] feststellten — die Glutathionkonzentration nicht zu hoch ist. Zuverlässige Ergebnisse erfordern eine prompte Analyse des ausgedrückten Saftes, da vornehmlich bei Kirschsaft mit der Zeit eine Abnahme des scheinbaren Vitamin-C-Gehalts, bei Himbeersaft nach Art einer Reaktion 1. Ordnung, erfolgt, der zur Deutung der oft sehr streuenden chemischen Vitamin-C-Bestimmungen herangezogen werden kann. Der Ascorbinsäuregehalt wird stets konstant, also unabhängig von der Zeit der Analyse befunden. Sulfhydrylverbindungen schützen offenbar die Ascorbinsäure vor einer Oxydation. — Das Analysenverfahren gestattet z. B. bei Tomaten auch eine Untersuchung von Proben an verschiedenen Stellen *einer* Frucht. K. Cruse.

In einem Beitrag zur Vitamin D-Bestimmung berichten J. Brüggemann, K. Blunk, W. Krauss und H. Karg[3] über chemische und biologische Bestimmungsverfahren. Die chemischen Methoden reichen in ihrer Empfindlichkeit nicht an die biologischen Verfahren heran und sind daher bei biologischem Material nur dort angezeigt, wo die Vitamine D_2 und D_3 in reichlicher Menge vorliegen (z. B. in bestrahlten Hefepraparaten). Bei dem wichtigsten und bekanntesten chemischen Verfahren, das auf der Farbreaktion mit $SbCl_3$ beruht[4] und das heute in verschiedenen Modifikationen angewendet wird, sind störende Stoffe sorgfältig, am besten chromatographisch zu entfernen. Verff. sind der Meinung, daß die chemische Vitamin D-Bestimmung nur unter ganz besonderen Voraussetzungen ein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich des Vitamin D-Gehaltes einer biologischen Substanz zeigen kann. Die biologischen Teste prüfen den antirachitischen Effekt vorzugsweise an Albinoratten. Die einzelnen Ausführungsformen unterscheiden sich durch die Diätformen, die Versuchsdauer, die Wahrnehmung und Auswertung des Vitamin D-Effektes und durch die Anlage als prophylaktischer oder kurativer Test. Die Durchführung der verschiedenen Teste wird ausführlich beschrieben. Wegen Raummangel muß auf die Beschreibung der biologischen Teste, die von Durchschnittschemikern ohnedies nicht durchgeführt werden können, verzichtet werden. L. Acker.

Zur biologischen Bestimmung von Vitamin D mit Hilfe des Reihentestes an Ratten modifizieren C. I. Bliss, C. Whitman, F. G. McDonald und C. E. Bills[5] verschiedene Bedingungen. Zur Untersuchung kamen Rattenwürfe aus jeweils 6 Ratten; für die Versuche selbst kam Kabeljaulebertran (U.S.P. Reference Nr. 2) zur Anwendung. Durch Beobachten der Zerstörung bei der Knochenbildung infolge Vitamin D-freier Kost und anschließenden Vitamin D-Gaben konnte die

[1] J. Amer. chem. Soc. **62**, 3061 (1940).

[2] Analyt. Chemistry **22**, 525 (1950); vgl. diese Z. **132**, 231 (1951).

[3] Pharmazie **9**, 446—452 (1954). Univ. München.

[4] Vgl. Brüggemann, J., W. Krauss u. J. Tiews: diese Z. **135**, 241 (1952); **137**, 421 (1953); **141**, 161, 174 (1954); Krauss, W., u. H. Grund: diese Z. **142**, 173 (1954).

[5] J. Assoc. off. agric. Chemists **37**, 499—508 (1954).

Bestimmung durchgeführt werden. Als Maßstab dienten BILLS Einheiten von 0 (bei keiner Heilung) bis zu 4 (bei vollständiger Heilung). Als am besten geeignete Knochen erwiesen sich zur Untersuchung Radia und Tibia, wobei die Tibia noch empfindlicher als die Radia erschienen. Bei Untersuchung von 272 solcher Knochen ergab sich eine Abweichung von 0,204 Einheiten. Um Fehlermöglichkeiten auszuschalten (z. B. verschiedene Nahrungsaufnahme) wurden alle Ratten eines Wurfes zur selben Zeit der Diätfütterung unterworfen. Die Abweichungen der Ergebnisse waren zwischen den einzelnen Würfen größer als innerhalb eines Wurfes. Als tägliche Dosis kam 1,5—6 mg zur Anwendung, die Versuchsperiode erstreckte sich über 7 Tage. Beim Auftragen des log der täglichen Lebertrandosis gegen den Heilungsgrad ergab sich eine geradlinige Kurve; die durchschnittliche Abweichung des log der Dosis bei täglich 1,5 mg Lebertran betrug 0,256 $\pm$ 0,051. DORIS HEILIGMANN.

Zur Bestimmung von Vitamin E in Lebens- und Futtermitteln haben S. NOBILE und H. MOOR[1] ein einfaches und schnelles Verfahren ausgearbeitet, das auf der Methode von A. EMMERIE und C. ENGEL[2] beruht (Oxydation von Vitamin E mit Ferrichlorid und colorimetrische Messung des Eisen(II)-chlorids mit α,α'-Dipyridyl) und für Reihenuntersuchungen von fettarmem und fettreichem Material geeignet ist. — *Arbeitsweise.* 1. *Aufstellung der Eichkurve.* 90—100 mg dl-α-Tocopherol werden in einem 100 ml-Meßkolben rasch gewogen, sofort in abs. Äthanol gelöst und zur Marke aufgefüllt. Die Lösung ist bei 4° C im Dunkeln 5—10 Tage haltbar. Abgestufte Mengen dieser Standardlösung (0—200 μg Vitamin E) werden in 25 ml-Meßkolben gegeben, mit je 1 ml 0,2%iger alkoholischer Eisenchloridlösung und 1 ml 0,5%iger alkoholischer α,α'-Dipyridyllösung versetzt und mit abs. Äthanol aufgefüllt. Genau 2 min nach dem Zusatz der α,α'-Dipyridyllösung mißt man die Extinktion der Farblösung gegen abs. Äthanol bei 515 mμ. — 2. *Durchführung der Analyse.* In 2 Schliffkolben wird die gleiche Menge Substanz (mit mindestens 50 μg Vitamin E) eingewogen, jedoch nicht mehr als 3 g Fett. In einen Kolben wird außerdem eine der Einwaage entsprechende Menge der Standardlösung zugesetzt. Beide Kolben werden nun folgendermaßen weiterbehandelt: Nach Zugabe von 5 ml abs. Methanol und 0,5 ml einer frisch bereiteten 50%igen wäßrigen Natriumascorbinatlösung (als Oxydationsschutz) wird ein Steigrohr aufgesetzt und die Mischung unter zeitweiligem Umschwenken im Wasserbad bei 60—70° C 5 min lang erwärmt. Dann gibt man durch das Steigrohr 15 ml n-methanolische Kalilauge zu und verseift 15 min bei 60—70° C. Nach Abkühlen auf etwa 40° C setzt man durch das Steigrohr 100 ml abs. Methanol hinzu, schüttelt um und gibt die Mischung in einen 250 ml-Schüttelzylinder, wobei man mit 25 ml Methanol nachspült. Man schüttelt kräftig mit 150 ml Petroläther (Kp 30—40° C) aus, setzt 15 ml dest. Wasser zu und schüttelt nochmals kräftig. Nach der Schichtentrennung wäscht man 125 ml der Petrolätherphase in einem zweiten Schüttelzylinder mit 20 ml Wasser, entfernt dieses und schüttelt den Petroläther mit etwa 20 ml n Salzsäure. Ein aliquoter Teil der Petrolätherlösung (entsprechend 50—150 μg Vitamin E) wird im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ml Petroläther aufgenommen und zur Entfernung von Carotinoiden, Sterinen usw. chromatographisch gereinigt. Dazu wird das Chromatographierrohr (Abb. im Original) etwa 12 cm hoch mit aktiviertem Aluminiumoxyd[3] beschickt, Petroläther hindurchgegossen

[1] Mitt. Gebiete Lebensmitteluntersuch. Hyg. (Bern) **44**, 396—402 (1953). Hoffmann-La Roche & Co., A-G, Basel.

[2] Recueil Trav. chim. Pays-Bas **57**, 1351 (1938); **58**, 283, 895 (1939); vgl. diese Z. **123**, 56 (1942).

[3] 50 g durch Glühen (etwa 400° C) aktiviertes Al_2O_3 werden im verschlossenen Kolben mit 6 ml Wasser geschüttelt, bis alle Knollen zerfallen sind.

und der Auslaufhahn geschlossen, bis die Al_2O_3-Schicht etwa 1 cm überdeckt ist. Dann gibt man die Lösung des Rückstandes durch die Säule, wäscht mit 40 ml Petroläther nach und eluiert mit 50 ml Benzol. (Bei Anwesenheit von Vitamin A wird der Rückstand zunächst mit 1 ml Antimontrichloridreagens[1] versetzt und nach kurzem Umrühren und Erwärmen auf etwa 70° C im Wasserbad unter Vakuum eingedampft. Man nimmt in 10 ml Petroläther auf und chromatographiert wie oben beschrieben.) Nach Eindampfen des Eluats im Vakuum wird der Rückstand in 23 ml abs. Äthanol aufgenommen und nach Zusatz von je 1 ml $FeCl_3$- und Dipyridyllösung weiterbehandelt, wie unter I. beschrieben. Die Berechnung erfolgt nach der Gleichung: μg Vit. E % g $= 100 \times d \times b/(a - b) \times c$; hierbei bedeutet a die μg Vitamin E im Analysenmaterial + Zusatz, b die μg Vitamin E im Analysenmaterial ohne Zusatz, c die Einwaage in g und d die zugesetzten μg Vitamin E. — Zur Extraktion von Vitamin E aus *Milch und Milchprodukten* verfährt man in Anlehnung an die Methode von Gottlieb-Röse[2] wie folgt: 40 ml Frischmilch oder 40 ml eines in dest. Wasser gelösten Milchproduktes werden im 250 ml-Schüttelzylinder nacheinander mit folgenden Reagentien versetzt, wobei nach jedem Zusatz kräftig geschüttelt wird: 10 ml 25%ige Ammoniaklösung, 40 ml abs. Äthanol, 80 ml peroxydfreier Äthyläther und 80 ml Petroläther (Kp 30—40° C). Nach 15—20 min langem Stehenlassen im Dunkeln stellt man das Volumen der überstehenden Flussigkeit fest und mißt 2mal einen aliquoten Teil in die Verseifungskolben ein (entspr. mindestens je 50 μg Vitamin E). Nach Zusatz einer entsprechenden Menge Standardlösung in den einen Kolben dampft man bei 60—70° C im Vakuum ein und verfährt weiter wie oben beschrieben. H. Sperlich.

Die Arbeitsvorschrift für die Bestimmung von Vitamin E im Weizenkeimöl nach H. Koch und W. Ponsold[3] enthält nach Mitteilung der gleichen Verff.[4] einen Fehler: Statt 0,5 ml soll es 5 ml absolutes Äthanol heißen. E. Baertich.

Über die Bestimmung von Vitamin E in Baumwollsamen berichten B. D. Deacon und A. C. Wamble[5]. Zur Extraktion des Baumwollsamenöls wird empfohlen, das abgepreßte Rohöl 4 Std lang mit Hexan unter Stickstoffzufuhr im Soxhlet zu extrahieren. Um störende Substanzen bei der Bestimmung der Gesamttocopherole zu entfernen, wird eine Molekulardestillation nach M. L. Quaife und P. L. Harris[6] durchgeführt. Ein aliquoter Teil des so gereinigten Destillats dient zur Bestimmung der Gesamttocopherole, die man erhält, indem man die Extinktion der erhaltenen Farblösung nach Zusatz von Dipyridyl und Eisen(III)-chlorid in alkoholischer Lösung bei 520 mμ im Beckman-Spektrophotometer mißt. Ein weiterer aliquoter Teil wird zur Bestimmung des γ-Tocopherolgehaltes nach der Methode von L. Weisler, C. D. Robeson und J. G. Baxter[7] verwendet. Man verfährt so, daß man nach Zusatz einer Diazoreagenslösung die Extinktion bei 510 mμ mißt. Der Anteil an α-Tocopherol ergibt sich dann aus der Differenz von Gesamttocopherol und

[1] 22 g $SbCl_3$ werden in 100 ml Chloroform unter Erwärmen gelöst und über hochaktivem Al_2O_3 in dunkler Flasche aufbewahrt. Vor Gebrauch wird durch ein dreifaches Filter filtriert.

[2] Schweiz. Lebensmittelbuch, 4. Ausgabe, S. 53, Bern, 1937.

[3] Pharmaz. Zentralhalle Deutschland **92**, 1 (1953); vgl. diese Z. **143**, 155 (1954).

[4] Pharmaz. Zentralhalle Deutschland **92**, 90 (1953). Univ. Halle/S.

[5] J. Amer. Oil Chemists' Soc. **31**, 284—287 (1954). Cottonseed Products Res. Lab., Texas Engincering Exper. Station, Texas A (USA).

[6] Analyt. Chemistry **20**, 1221 (1948) und Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **18**, 707 (1946).

[7] Analyt. Chemistry **19**, 906 (1947).

γ-Tocopherol. Bei Anwendung dieser Methode konnte bei Doppelbestimmungen eine gute Übereinstimmung erzielt werden. Verf. diskutieren ferner verschiedene Einflüsse, wie Art der Samen, Standort und Lagerung, auf den Vitamin E-Gehalt. Ein wesentlicher Verlust an Vitamin E konnte hierbei, sowie auch beim Kochen des Endosperms nicht festgestellt werden. Bei sorgfältiger Extraktion des Endosperms mit Methanol und Herauslösen des Vitamins E mit Hexan konnte ein höherer Vitamin E-Gehalt als im Weizenkeimöl festgestellt werden. Doris Heiligmann.

Eine Nitrierungsmethode zur Bestimmung von d-γ-Tocopherol beschreibt B. H. Polister[1]. Wesentlich ist dabei die Verwendung von Dimethoxyäthan als Lösungsmittel und Isooctan als Extraktionsmittel, wodurch Störungen vermieden werden, die bei dem Verfahren nach M. L. Quaife[2] auftreten. — *Arbeitsweise.* (Die Ausführung soll bei gedämpftem, künstlichem Licht vorgenommen werden.) 5 ml der Tocopherollösung (0,10 –1,20 mg ml) in frisch destilliertem, peroxydfreiem Dimethoxyäthan versetzt man mit 0,2 ml Eisessig, mischt, gibt dann schnell 3,0 ml 2%ige Natriumnitritlösung zu, rührt 5 sec heftig um und läßt 1 min stehen. Darauf fügt man 2 ml 20%ige Kalilauge zu, mischt und versetzt mit 10 ml Wasser, einer Spatelspitze von wasserfreiem Natriumsulfat und 10 ml Isooctan. Man schüttelt 30 sec heftig, läßt absitzen und photometriert die Isooctanschicht bei 450—350 mμ (Maximum bei 415 mμ) im Sichtbaren und 340—280 mμ (Maximum bei 305 mμ) im UV. Ein Blindwert wird ebenfalls bestimmt und von den Messungen abgezogen. Bei Ausschluß von Tageslicht bleibt die Färbung mindestens 1 Std beständig. Das Beersche Gesetz wird über einen weiten Bereich hin erfüllt. Der mittlere Fehler beträgt $\pm$ 5%. Hildegard Telschow.

Die colorimetrische Bestimmung von Calciumpantothenat nach C. R. Szalkowski und J. H. Davidson, jr.[3] beruht auf der Reaktion der nach Hydrolyse neben β-Alanin erhaltenen α, γ-Dioxy-β,β-dimethylbuttersäure mit 2,7-Dioxynaphthalin. Die dabei sich bildende grünlichgelbe Farbe wird spektrophotometrisch bei 465 mμ ausgewertet. Das Beersche Gesetz ist über einen weiten Bereich (0–500 μg Calciumpantothenat) erfüllt. Die Färbung bleibt über 18 Std beständig. *Arbeitsweise.* 100 mg der Probe löst man in Wasser und füllt auf 100 ml auf. 25 ml davon gibt man in einen 250 ml-Kolben, setzt 40 ml Wasser und 5 ml konz. Schwefelsäure zu und kocht 1 Std unter Rückfluß. (Zur Aufstellung der Eichkurve verwendet man 25 ml einer Standardlösung, die je ml 1,0 mg Calciumpantothenat enthält.) Man überführt in einen 100 ml-Meßkolben und füllt mit Wasser auf. In Reagensgläsern mit Glasstöpseln (2,5 $\times$ 20 cm) kühlt man je 1 ml 5 min lang in Eismischung, versetzt jedes der Gläser mit 10 ml Dioxynaphthalinreagens (500 mg 2,7-Dioxynaphthalin in 500 ml konz. Schwefelsäure lösen und bis zur Entfärbung stehen lassen [18—24 Std]; wöchentlich frisch bereiten und vor Licht geschützt aufbewahren). Nach vorsichtigem Umschütteln erhitzt man 30 min im siedenden Wasserbad, kühlt dann 5 min in Eiswasser ab, versetzt mit 15 ml verd. Schwefelsäure (1:1), läßt 30 min bei Zimmertemperatur stehen und mißt gegen eine Blindlösung aus den gleichen Reagentien bei 465 mμ. Verbindungen wie Thiamin, Pyridoxin, Cholin, Niacin, Vitamin A und D, Vitamin B_{12}, α-Tocopherol, Citronensäure, Weinsäure und β-Alanin stören die Reaktion nicht. Riboflavin dagegen muß durch Chromatographie der wäßrigen Lösung an einer Florisilsäule entfernt werden. Ascorbinsäure, Glucose und Lactose werden durch Behandlung mit $Ca(OH)_2$ und Kupfersulfatlösung zerstört. - Von *Vitaminmischungen* wird eine Einwaage, die

[1] Analyt. Chemistry **26**, 407—408 (1954). Univ. Los Angeles, Calif. (USA).
[2] J. biol. Chemistry **175**, 605 (1948).
[3] Analyt. Chemistry **25**, 1192—1195 (1953). Merck & Co., Inc., Rahway, N.J.

100 mg Calciumpantothenat entspricht, mit 100 ml Wasser geschüttelt und filtriert. 25 ml dieser Lösung gibt man auf eine Säule aus 4 g eines durch Kochen mit Pyridin-Eisessig-Wasser (20:2:78) und anschließendem Waschen und Trocknen vorbereiteten Florisils. Man wäscht mit 25 ml Wasser nach, vereinigt Filtrat und Waschwasser, fügt 1 g wasserfreies Kupfersulfat und 3 g $Ca(OH)_2$ hinzu, läßt 30 min unter gelegentlichem Schütteln stehen, filtriert, wäscht mit 25 ml Wasser, gibt 5 ml konz. Schwefelsäure zu, kocht 1 Std unter Rückfluß und verfährt dann wie oben beschrieben. L. Acker.

Juglon. *Das polarographische Verhalten des Juglons und seine Bestimmung in Gegenwart von Ascorbinsäure in den Früchten und den grünen Teilen der Walnuß* (Juglans regia) wurde von P. Zuman[1] untersucht. Es gelingt, die beiden Verbindungen nebeneinander festzustellen. Die Untersuchungsergebnisse in verschiedenen Teilen der Pflanze während einer Vegetationsperiode werden mitgeteilt. *Juglon* (5-Oxynaphthochinon) ist polarographisch durch eine reversible Stufe gekennzeichnet, die mit einer Adsorptionsvorstufe verbunden ist. Aus der Abhängigkeit des Halbstufenpotentials $\pi_{\frac{1}{2}}$ vom p_H-Wert wurden drei Dissoziationsexponenten, $pK_{red_1} = 7{,}0$, $pK_{ox} = 8{,}7$ und $pK_{red_2} = 11{,}0$ abgeleitet. H. Freytag.

Coffein. Nach J. Richter[2] kann Coffein in Kaffeeaufgüssen photometrisch als Perjodid $C_4H_{11}O_2N_4 \cdot HJ \cdot J_4$ bestimmt werden. *Arbeitsvorschrift.* 10 ml des Kaffeeaufgusses (mit weniger als 40 mg-% Coffein), der auch Zucker oder Kaffee-Ersatzbestandteile enthalten kann, versetzt man mit 0,5 ml 15%iger Natronlauge und schüttelt 1 min mit 20 (bei Milchkaffee 40) ml Chloroform DAB VI aus. 10 (bzw. 20) ml des $CHCl_3$-Auszuges werden nach Zusatz von 5 ml Wasser vorsichtig abgedunstet; die zurückbleibende wäßrige Lösung wird nach dem Erkalten wenn nötig durch ein feuchtes Filter (3 cm ⌀) filtriert und dieses mit 1 ml 16%iger Schwefelsäure nachgewaschen. Inzwischen hat man in einen Jenaer Glasfiltertiegel G 4 2 ml 16%ige Schwefelsäure und darauf 2 ml 0,1 n-Jodlösung gegeben. Die Coffeinlösung wird nun in den Tiegel gebracht, mit 1 ml Wasser nachgewaschen und 1 min stehen gelassen. Dann wird abgesaugt, der Rückstand, nachdem 2 min lang Luft hindurchgesaugt wurde, durch Zusatz von 25 ml Methanol gelöst und unter Verwendung eines Saugtopfes langsam in ein 50 ml-Becherglas filtriert. Nach Waschen des Tiegels mit 25 ml Wasser wird die gelbgefärbte Methanol-Wasserlösung in einer 2 cm-Küvette mit Filter S 47 in einem Pulfrich-Apparat bei 22° C photometriert. Die Kompensation erfolgt mit einer entsprechend hergestellten Blindlösung. Die mit je 5 ml Coffeinlösung von 20 und 40 mg-% Gehalt hergestellte Eichkurve verläuft bis zur Extinktion 0,900 annähernd geradlinig. Die Erfassungsgrenze beträgt 5 mg-% Coffein.

Die quantitative Bestimmung von Coffein und Phosphorsäure in Erfrischungsgetränken wird nach V. Hamann[3] folgendermaßen durchgeführt: 40 ml durch Erwärmen und Schütteln CO_2-frei gemachter Limonade werden in einem 60 ml-Meßkolben nach Zusatz von 4 ml 20%iger Kupfersulfatlösung und 4 ml n Natronlauge mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, gut geschüttelt und filtriert. 40 ml des neutralen Filtrates werden in einem 5 ml $CHCl_3$ enthaltenden, nicht gefetteten Schliffschütteltrichter mit 1 ml, dann tropfenweise weiter mit 5%iger $KMnO_4$-Lösung versetzt, bis bleibende Rotstichigkeit auftritt. Nach weiterem Aufhellen der Untersuchungsflüssigkeit durch Zusatz von 3 ml frisch hergestellter $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$-Lösung (10%ig) und 0,3—0,5 ml H_2SO_4 (D 1,35) wird je 2 min lang

[1] Chem. Listy 48, 524—532 (1954) [Tschechisch]. Pol. Inst., Akad. Wiss., Prag.

[2] Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 98, 107—110 (1954). Univ. Leipzig.

[3] Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. 98, 213—218 (1954). D. Forsch.-Anst. Lebensmittelch., München.

kräftig mit 4mal 15 ml, dann mit 10 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die sich scharf abtrennenden Auszüge werden einzeln durch einen Wattebausch in einen 100 ml-Kjeldahl-Kolben filtriert, nach Waschen der Watte mit 5 ml $CHCl_3$ wird auf dem Wasserbad über einen LIEBIG-Kühler abdestilliert und der Rückstand durch vorsichtiges Abblasen von den Lösungsmittelresten befreit. Er wird durch Erhitzen mit 4 ml konz. H_2SO_4 unter Zusatz einer Spur Se und zweier Glasperlen nach KJELDAHL aufgeschlossen, wobei die Innenwandung des Kolbens nochmals mit 1 ml Schwefelsäure abgespült wird. Nach Verdünnung des Aufschlusses mit 20 ml Wasser, und Zusatz von 20 ml 33%iger Natronlauge wird das freigesetzte NH_3 in eine mit 20 ml 2%iger Borsäurelösung und 3 Tropfen TASHIRO-Indicator beschickte Vorlage destilliert und aus einer Feinbürette mit 0,01 n Salzsäure titriert. Die ml verbrauchter 0,01 n Salzsäure × 0,4853 × 100 : 25,6 ergeben mg Coffein in 100 ml Limonade. — Die Ermittelung der Phosphorsäure erfolgt nach der Methode von O. REICHARD[1], nachdem die organische Substanz durch Oxydation auf nassem Wege mit $KMnO_4$ zerstört wurde (Arbeitsvorschriften im Original). K. SÖLLNER.

Zum Nachweis eines Zusatzes von künstlichem Kaffeearoma zu Kaffee-Extrakten zieht G. SÉRIS[2] die spektrophotometrische Untersuchung des Hexanauszuges heran. Während die alkoholischen und ätherischen Auszüge aus natürlichen und künstlich verstärkten Kaffeeextrakten spektrophotometrisch keine nennenswerten Unterschiede zeigen, weisen die Absorptionskurven der entsprechenden Auszüge in Hexan charakteristische und zum Nachweis geeignete Unterschiede auf. So besitzt der Auszug aus natürlichem Kaffee-Extrakt ein Maximum bei 270 mμ, derjenige aber aus künstlich verstärktem Extrakt gleich drei Maxima, eines bei 270 mμ und zwei kleinere bei 315 mμ und 370 mμ. Die Hexanauszüge werden gewonnen, indem man 1 ml des Extraktes mit 10 ml Wasser verdünnt, mit 10 ml Hexan 2 min schüttelt, zentrifugiert und die organische Schicht abtrennt. Auch die Absorption der Lösung der flüchtigen Substanzen aus Kaffee-Extrakten in Hexan weist bei Zusatz künstlicher Stoffe charakteristische Veränderungen auf, da im verstärkten Extrakt ein Maximum bei 315 mμ beobachtet wird und zwar schon bei einem Zusatz von 0,1% des künstlichen Aromas. Man stellt sich die Lösung der flüchtigen Substanzen so her, daß man in einen Erlenmeyer-Kolben 10 ml Hexan gibt, im Kolbenhals ein Papierfilter, das mit 1 ml des Extraktes getränkt ist, befestigt und einige Tage stehen läßt. L. ACKER.

2. Auf Physiologie und Pathologie bezügliche Methoden.

Sulfhydrylgruppen. *Bei der amperometrischen Titration mit Sublimatlösung* stört Natriumsulfit, wenn an der rotierenden Platindrahtelektrode titriert wird, dagegen stört es nicht bei Benutzung der Quecksilbertropfelektrode. W. STRICKS, I. M. KOLTHOFF und N. TANAKA[3] bauen darauf eine neue polarographische und amperometrische Methode zur *Bestimmung von Cystin* und reduziertem oder oxydiertem *Glutathion* auf, vor allem zur Disulfidanalyse teilweise oder völlig hydrolysierter *Proteine*. — Werden luftfreie Lösungen von Cystin oder Glutathion in Boraxpufferlösung bei p_H 9,2 und mit 0,5 m Kaliumchlorid in Gegenwart von überschüssigem Natriumsulfit (0,2 m) polarographiert (m = 2,17 mgsec^{-1}, t = 3,91 sec bei offenem Stromkreis, $m^{2/3}t^{1/6} = 2{,}104\ mg^{2/3}sec^{-1/2}$, 60 cm Hg-Säule und 25° C), so ist das nach der Gleichung: $RSSR + SO_3^{--} \rightarrow RS^- + RSSO_3^-$ zu Sulfhydryl um-

[1] Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **85**, 158 (1943).

[2] Ann. Falsificat. Fraudes **47**, 26—29 (1954). Lab. Central, Serv. Repress. Fraudes.

[3] Analyt. Chemistry **26**, 299—303 (1954). Univ. Minneapolis, Minn. (USA).

gesetzte Disulfid an einer anodischen Stufe kenntlich, deren bei — 0,35 V gemessene Höhe dem Disulfidgehalt proportional und praktisch gleich ist. Sulfonat stört nicht. Wird Quecksilber(II)-chlorid zugesetzt (0,01 m), dann verschwindet die anodische Stufe mit der Hg^{++}-Zugabe zufolge der Reaktion: $2RS^- + Hg^{++} \rightarrow Hg(RS)_2$ und ist beim Verhältnis 2 : 1 vollständig beseitigt zugunsten einer kathodischen Stufe des gebildeten Mercaptids, die beim Äquivalenzpunkt einen Maximalwert erreicht. Da sie bei Quecksilbersalzüberschuß durch die Hg-Reduktionsstufe, die bei positiveren Werten liegt, überdeckt wird, steigt der bei — 0,8 V gemessene Diffusionsstrom weiter an. — *Bestimmung von Cystin, reduziertem und oxydiertem Glutathion.* Zu 10 ml Boraxlösung (0,1 m) und 2,5 ml 4 m Kaliumchloridlösung werden 10 ml reines Chloroform zur Isolierung des abgetropften Quecksilbers gegeben. Nach Zugabe des Disulfids (bis etwa $3 \cdot 10^{-3}$ m) und 4 ml 1 m Natriumsulfitlösung wird auf 20 ml ergänzt. Tropfelektrode und Brücke zur Kalomelelektrode eingesetzt und bei — 0,35 V unter Stickstoff mit Sublimatlösung (0,01 m) titriert. Getrennt wird der Grundstrom an einer Blindprobe gemessen, der als Endpunkt der Titration gilt. Die Genauigkeit der Methode liegt bei $\pm 1\%$. — *Zur amperometrischen Titration* mit Pepsin verdauter und dann *hydrolysierter Proteine* (5 ml 7%ige Proteinlösung mit 0,005%iger Pepsinlösung in 0,05 m Salzsäure auf 25 ml aufgefüllt; 10 ml davon nach 1 Std bei 25° C mit 2 ml 6 m Salzsäure 2 Std auf dem Sandbad am Rückfluß hydrolysiert und anschließend zu 25 ml ergänzt), oder nur mit Salzsäure hydrolysierter Proteine (2 ml 7%iger Proteinlösung mit 8 ml Wasser, 7,2 ml 12 m Salzsäure 2 Std auf dem Sandbad am Rückfluß gekocht und auf 25 ml aufgefüllt) werden 10 ml 0,1 m Boraxlösung, 2,5 ml 4 m Kaliumchloridlösung und 10 ml Chloroform mit zur Neutralisation der freien Säure ausreichender Menge 1 m Natronlauge versetzt (Probe mit Methylrot). Nach Zugabe von 4 ml 1 m Natriumsulfitlösung und Hydrolysat (die Konzentration soll $1—8 \cdot 10^{-4}$ m an Disulfid sein) wird mit 0,01 m Sublimatlösung titriert. — In gleicher Weise vorbereitete Lösungen können zur Aufnahme des *Polarogramms* von — 0,2 bis — 0,8 V verwendet werden. Die Genauigkeit der Bestimmungen liegt bei 2%. Die Methode wird zur Analyse von normalem und pathologischem Blutserum und deren Albumin- und Globulinfraktionen verwendet. K. Cruse.

Sulfhydrylgruppen in biologischem Material können nach I. M. Kolthoff, W. Stricks und L. Morren[1] mercurimetrisch-amperometrisch bestimmt werden, wobei als Indicatorelektrode eine rotierende Platinelektrode dient. Das argentometrische Verfahren liefert nach Untersuchungen der Verff. nur in Gegenwart von viel Alkohol befriedigende Werte[2]. Es ist daher nur für solche Stoffe anwendbar, die in alkoholhaltigem Medium löslich sind und versagt bei Proteinen, weil diese denaturiert und ausgefällt werden. Dagegen zeigten polarographische Untersuchungen der Reaktion zwischen Quecksilber und Cystein bzw. reduziertem Glutathion, daß sich darauf ein mercurimetrisches Verfahren aufbauen läßt. Das bei dieser Reaktion zunächst entstehende Mercaptid $Hg(GS)_2$ reagiert bei p_H über 2,5 mit überschüssigem Quecksilber zu $Hg_2(GS)_2$ und $Hg_3(GS)_2$. Grundlage der mercurimetrischen Bestimmung von Sulfhydrylgruppen ist die Bildung derjenigen Verbindung, die ein Hg-Atom auf eine Sulfhydrylgruppe enthält, d. h. $Hg_2(GS)_2$ oder GS—Hg—X, wobei X ein Halogen oder eine Aminogruppe sein kann. — *Arbeitsweise. 1. Bestimmung von Glutathion* (I) und *Cystein* (II). Zu 30 ml Pufferlösung (0,05 m Borax und 0,1 m KCl) wird, nachdem die Luft durch Stickstoff verdrängt

[1] Analyt. Chemistry **26**, 366—372 (1954). Univ. Minneapolis, Minn. (USA).

[2] Benesch, R., and R. E. Benesch: Arch. Biochemistry **19**, 35 (1948); vgl. diese Z. **134**, 464 (1951/52). — Stricks, W., I. M. Kolthoff and N. Tanaka: Analyt. Chemistry **26**, 299 (1954); siehe das vorhergehende Referat.

ist, soviel von der Probe gegeben, daß die Gesamtkonzentration von I bzw. II zwischen 10^{-5} und 6×10^{-4} Mol liegt. Man titriert unter dauerndem Einleiten von Stickstoff mit Quecksilber(II)-acetat- oder -chloridlösung (10^{-3} bis 2×10^{-3} Mol) bei einem Potential von —0,2 Volt. 1 ml 10^{-3} m HgCl-Lösung ≙ 0,307 mg I ≙ 0,121 mg II. Zur Bestimmung von I wird eine mit Quecksilber bedeckte Platinelektrode verwendet, die nach jeder Titration mit dest. Wasser abzuspülen ist. Vor der Bestimmung von II wird die Platinelektrode 5 min in warme Salpetersäure getaucht und mit dest. Wasser gewaschen. *2. Zur Bestimmung von Sulfhydrylgruppen in Proteinen* gibt man zu 30 ml Pufferlösung (0,01 m NaH_2PO_4 –, – 0,08 m Na_2HPO_4 –, + 0,5 m KCl-Lösungen) soviel von der Probe, daß die Gesamtkonzentration an Sulfhydryl 1 bis 7×10^{-5} Mol beträgt. Die Bestimmung erfolgt wie oben beschrieben; die Elektrode wird wie bei der Titration von I behandelt. Mischungen von I und Protein werden wie I titriert; II kann in Mischungen mit I oder Protein nicht mercurimetrisch bestimmt werden. H. Sperlich.

Zur Bestimmung von HS-Gruppen in Eiweißstoffen modifizierte O. Pihar[1] die auf der Reaktion mit *Chlorquecksilber(II)-benzoat* beruhende Methode[2]. Verf. versetzt die zu untersuchende Probe mit einem Überschuß des Reagenses und titriert den unverbrauchten Rest mit Cysteinlösung potentiometrisch zurück. Durch das Verfahren werden im allgemeinen die freien SH-Gruppen in nativen Eiweißstoffen erfaßt. Von einem gewissen Überschuß des Reagenses an kommt es zur teilweisen Denaturierung der Eiweißstoffe. Dieser Überschuß ist für die verschiedenen Eiweißstoffe verschieden hoch. Es wird ein Verfahren zu seiner Bestimmung aus dem Verlauf der Titrationskurve beschrieben. — Die Herstellung des Reagenses erfolgt durch Auflösen der Chlorquecksilber(II)-benzoesäure in Natronlauge, neutralisieren mit Salzsäure und Verdünnen mit Wasser auf das erforderliche Volumen. Die mehrere Stunden haltbare Cysteinhydrochloridlösung wird täglich frisch bereitet. Als Indicatorelektrode dient ein glattes Silberblech, das nach jeder Titration mit einem feinen Schmirgelpapier zu reinigen ist. Vergleichselektrode ist die gesätt. Kalomelelektrode. Man titriert in Phosphatpufferlösung von p_H 7,3—8,5. 1 ml 10^{-3} m Chlorquecksilber(II)-benzoatlösung entspricht 33 μg HS. — *Bestimmung von HS-Gruppen in Plasma und Serum.* 0,2 ml Blut (aus der Fingerbeere) vermischt man mit 1,8 ml physiologischer NaCl-Lösung und pipettiert 1,5 ml des erhaltenen verdünnten Plasmas in ein Gemisch von 1,0 ml $5 \cdot 10^{-4}$ m Reagens- und 4,5 ml 0,1 m Dinatriumhydrogenphosphatlösung. Die Rücktitration erfolgt mit gegen das Reagens eingestellter 5.10^{-4} m Cysteinlösung.

Über das polarographische Verhalten von HS-Verbindungen in Serum und Blut stellten L. Jirousek und M. Petráčková[3] Untersuchungen an, die ergaben, daß polarographische Stufen von HS-Verbindungen nur in dem enteiweißten Blut bemerkbar sind. Die polarographische Bestimmung beschränkt sich auf vergleichende Untersuchungen einer bestimmten Fraktion der HS-haltigen Stoffe unter Standardbedingungen. Die Gesamtmenge von HS-Verbindungen im Blut erscheint wegen der Anwesenheit anderer reduzierend wirkender Stoffe unbestimmbar. H. Freytag.

Zur polarographischen Untersuchung des Blutserums Krebskranker (Bestimmung des Sulfhydrylgehaltes) verbessert I. M. Kolthoff[4] die Vorschrift der polarographischen Analyse nach Brdička und beschreibt außerdem ein ampero-

[1] Chem. Listy **47**, 1647—1651, 1652—1656 (1953) [Tschechisch]. Univ.-Krankenhaus, Prag.

[2] Vgl. diese Z. **142**, 440 (1954).

[3] Chem. Listy **48**, 260—264 (1954) [Tschechisch]. Zentr. endokrin. Inst., Prag.

[4] Pharmac. Weekbl. **88**, 733—744 (1953). Univ. Minneapolis, Minn. (USA).

metrisches Titrationsverfahren der Sulfhydrylgruppen, das zur Diagnose mit herangezogen wird. — Zur *polarographischen Untersuchung* werden 0,5 ml Serum mit 1,25 ml 0,1 n Kaliumhydroxydlösung versetzt und 30 min sich selbst überlassen. Dann werden 1,5 ml 20%ige Sulfosalicylsäurelösung zugesetzt, es wird auf 5 ml aufgefüllt, kräftig geschüttelt und 8 min zentrifugiert. 1 ml des klaren Zentrifugats wird dann zu einer Mischung aus 0,5 ml 0,03 n Hexamminkobaltchloridlösung, 0,5 ml 1n Ammoniumchloridlösung, 1 ml 5 n wäßrigem Ammoniak und 1 ml Wasser gefügt und gut durchmischt. In üblicher Weise werden dann 1—2 ml zwischen — 0,8 und — 1,9 V polarographiert[1]. Der Betrag, um den die katalytische Wasserstoffstufe bei — 1,5 V die Co-Stufe bei — 1,2 V nach 30 min (h_{30}) übersteigt, ist bei pathologischem Serum höher als in Normalserum. — Zur *amperometrischen Titration* der Sulfhydrylgruppen werden 25 ml einer Lösung, die 0,1—0,2 Val Ammoniak und 0,2—0,3 Val Ammoniumnitrat im Liter enthält, mit Stickstoff durchlüftet und mit 0,5 ml Serum versetzt. Unter Stickstoff wird dann an der rotierenden Platindrahtelektrode bei — 0,3 V gegen eine gesätt. Kalomelelektrode mit 0,001 n Silbernitratlösung titriert. Zweckmäßig wird übertitriert und aus dem dann deutlich ansteigenden Diffusionsstrom rückwärts der Äquivalenzpunkt interpoliert. — Wird die Höhe h_{30} in Millimeter gemessen und der RSH-Gehalt in mg Cystein/100 ml, so bedeutet das Ergebnis $h_{30}/RSH > 6{,}7$, daß ein pathologisches Serum vorliegt. Ist das Verhältnis $< 4{,}4$, so handelt es sich um ein Serum, das mit größter Sicherheit nicht von einem Krebskranken stammt. — Der Sulfhydrylgehalt des Albumins in Normalserum schwankt zwischen 0,73 und 0,67 (Mittelwert 0,695), im Serum Krebskranker dagegen zwischen 0,78 und 0,37 (als mg Cystein in 100 ml Serum angegeben) und beträgt im Mittel nur 0,57. Für Globulin wurde entsprechend 0,67 bzw. 0,48 als Mittelwert festgestellt. K. Cruse.

Aminosäuren. *Eine neue Reaktion auf Aminsäuren* wurde von G. Curzon und J. Giltrow[2] gefunden. Sie beruht auf der Kondensation von *Vanillin* mit der Aminogruppe. — *Arbeitsweise.* Man benutzt eine frische 2%ige Lösung von Vanillin in n-Propanol, in die man das Papierchromatogramm eintaucht. Hierauf erhitzt man es 10 min lang auf 110° C, wobei viele Aminosäuretüpfel eine schwache gelbe Färbung annehmen. *Ornithin* hingegen zeigt starke, *Lysin* schwache grüngelbe Fluorescenz im UV-Licht. Dann taucht man das Chromatogramm in eine 1%ige alkoholische Kaliumcarbonatlösung und erhitzt wieder 10 min auf 110° C. Schon nach 30 sec nimmt Ornithin Lachsfarbe an und wird bei weiterem Erhitzen gelbbraun. *Prolin, Oxyprolin, α-, β- und γ-Pipecolinsäure, 1¹-Tetrahydropyridin-2-carbonsäure (Baikiain)* und Sarcosin sind als rote Tüpfel nach ungefähr 6 Std langem Belassen bei Raumtemperatur zu sehen. Das Färbungsmaximum wird nach Stehen über Nacht erreicht. β- und γ-Pipecolinsäure ergeben schwache Färbungen. Von den handelsüblichen α-Aminosäuren liefert nur *Glycin* starkes Grünlichbraun, die anderen keine oder nur undefinierbare schwachbraune Färbungen. Keine Reaktion erhält man mit β-Alanin, β- und γ-Aminoisobuttersäure, Glutathion, Betain, Hippursäure, Kreatinin, Glucocyamin, Äthanolamin, Pyrrol, Pyrrolidin, Pyrrolidon und Indol. Zum Entwickeln verwendet man am besten Butanol-Essigsäure-Kollidin-Lutidin- oder Aceton-Harnstoff-Wassergemische. Erfaßbar sind von Ornithin und Sarcosin je 0,5 μg, von Prolin, Oxyprolin, α-Pipecolinsäure, Baikiain je 1 μg, von β- und γ-Pipecolinsäure je 4 bzw. 5 μg.

[1] Wird das Serum stärker als 1 : 50 verdünnt, dann wird ein Zusatz von 0,05 ml gesättigter Coffeinlösung je 5 ml als Maximumunterdrücker empfohlen.

[2] Nature (London) **172**, 356—357 (1953). Inst. Orthopaed., Brockley Hill, Stanmore, Ms. (England).

Die colorimetrische Mikrobestimmung von Aminosäuren mit Ninhydrin in n-Butanol ist gegen Kationen empfindlich. Sie verzögern bei der Colorimetrie die Farbreaktion und verursachen verschiedene rote und blaue Färbungen anstatt der Purpurfärbung. H. Meyer und E. Riklis[1] fanden, daß die Zugabe von 0,1 ml einer 0,01 m Lösung von Ag-, Hg^{II}-, Cu^{II}-, Sn^{II}-, Fe^{II}-, Fe^{III}-, Mn^{II}- und Al-Salzen zu einem Gemisch von 0,1 ml Wasser mit 10 μg Alanin und 3 ml einer 0,1%igen Lösung von Ninhydrin in n-Butanol vollständig das Auftreten der Färbung verhindert. Ca-, Ba- und Cd-Ionen verursachen Rotfärbungen, deren Absorptionsmaxima sich bei 510 und 410 mμ (Ca und Cd) bzw. bei 530 und 410 mμ (Ba) befinden. Sie sind noch spektrophotometrisch nachweisbar, wenn im Reaktionsgemisch nur etwa 1 μg Kation anwesend ist. Diese Wirkung läßt sich vollkommen durch Äthylendiamintetraacetat (Komplexon III, Versene) aufheben. Die Empfindlichkeit der Reaktion wird merklich erhöht durch Pyridinzusatz. — *Bestimmung.* Man fügt zu 0,1 ml einer Lösung von 5—50 μg der zu ermittelnden Aminosäure 0,3 ml 0,3%ige Versenelösung in 0,066 m Citratpuffer (p_H 5) und 3 ml von aldehyd- und peroxydfreiem n-Butanol, in denen 3 mg Ninhydrin gelöst sind, und kocht 15 min lang unter Rückfluß. Nach der Auskühlung verdünnt man mit 50 Vol%igem Äthanol auf 10 ml und colorimetriert bei 570 mμ. Die Färbung ist wenigstens 10 Std stabil. *Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Serin, Lysin, Arginin, Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Tyrosin* und *Methionin*, 0,3—4,0 μg Aminostickstoff entsprechend, lassen sich mit einer mittleren Genauigkeit von $\pm$3% bestimmen. In der Papierchromatographie ist die Methode auch anwendbar.

W. Troll und R. K. Cannan[2], modifizierten *die photometrische Bestimmung von Aminosäuren und Iminosäuren mit Ninhydrin.* — *Ausführung. Aminosäuren.* Man erwärmt 0,4 bis 0,5 ml der Lösung (0,05—0,5 molar; p_H 1—8) mit 1 ml Kaliumcyanidlösung (2 ml 0,01 m-KCN-Lösung mit ammoniakfreiem [Permutit] Pyridin auf 100 ml aufgefüllt) und 1 ml Phenollösung (80 g in 20 ml abs. Alkohol gelöst und mit Permutit geschüttelt) auf dem siedenden Wasserbad, fügt 0,2 ml Ninhydrinlösung (500 mg in 10 ml abs. Alkohol) zu, verschließt das Gefäß und läßt 3—5 min stehen. Dann kühlt man ab, füllt mit 60 Vol%igem Alkohol auf 10 ml auf und mißt die optische Dichte bei 570 mμ. Einen Blindwert erhält man aus 0,4—0,5 ml ammoniakfreiem Wasser, das man genau so behandelt. *Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Serin, Threonin, Methionin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Histidin* und *Arginin* lassen sich so zu 98—102% bestimmen, Tryptophan nur zu etwa 75%, Lysin zu 110%. Peptide reagieren nicht quantitativ. Harnstoff, Kreatin und Kreatinin geben keine, Ammoniak (ebenso Sarcosin) nur eine schwache Färbung. — *Bestimmung von Oxyprolin.* 0,1 ml der Probelösung (mit 1—15 μg Oxyprolin) versetzt man in einem Reagensglas nach Folin-Wu mit 0,1 ml 0,1 m Phosphatpuffer (p_H 7,0) und 2,5 ml Benzol, taucht in ein Wasserbad von 75 $\pm$ 1° C, schaltet einen Vibrator ein und gibt 0,2 ml Ninhydrinlösung (0,1 m in Methylcellosolve) zu. Nach 5 min zieht man die Benzolschicht ab, verdünnt auf 10 ml und bestimmt die optischen Dichten bei 550 und 570 mμ. Die optische Dichte für Oxyprolin ergibt sich daraus als 1,46 D_{750}—0,592 D_{550}. Man kann so Oxyprolin in 0,02—0,1 μMol entsprechenden Lösungen in einem Gemisch von 16 Aminosäuren sowie Sarcosin und Prolin (0,05 m) zu 97,8—103% bestimmen, ebenso in Harn und Hydrolysaten von kristallisiertem Lactoglobulin, Ricin und von Gelatine. H. Freytag.

[1] Nature (London) **172**, 543 (1953). Hebrew Univ., Jerusalem (Israel).

[2] J. biol. Chemistry **200**, 802—811 (1953). Univ. Coll. Med., New York.

Zur photometrischen Bestimmung der DNP-Aminosäuren auf Grund der Reaktion von JANOVSKY und von BITTO bringt G. ZIMMERMANN[1] in Ergänzung früherer Versuche[2] einige experimentelle Einzelheiten. Die chromatographisch oder elektrophoretisch[3] getrennten DNP-Aminosäuren nimmt man mit alkalischer Acetonlösung auf (JANOVSKY-BITTO-Reaktion). Die rosa bis dunkelrote Farbe wird nach 30 min mit Grünfilter gemessen. Das BEERsche Gesetz ist im Bereich 25 bis 250 μg DNP-Aminosäure nicht exakt erfüllt, die Eichkurven sind leicht gekrümmt. Man kommt für die Gruppe der DNP-Monoaminomonocarbonsäuren (*Alanin, Serin, Valin, Leucin*) mit einer einzigen Einheitseichkurve aus. Für DNP-Prolin und DNP-Arginin müssen getrennte Eichkurven aufgestellt werden, da die beiden Aminosäuren wesentlich niedrigere Extinktionen besitzen als die oben genannten. A. KURTENACKER.

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Gehalts an verschiedenen Aminosäuren im Urin gibt T. H. J. HUISMAN[4] an. Er arbeitet im Prinzip nach der Methode von W. H. STEIN und S. MOORE[5], indem er die Aminosäuren an einem Kationenaustauscher (Dowex 50) adsorbiert und sie dann mit verschiedenen Pufferlösungen eluiert. Die einzelnen Fraktionen werden in einem Kollektor gesammelt. Die Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgt colorimetrisch mit Ninhydrin. Bezüglich der Einzelheiten der Apparatur und der Durchführung muß auf die Originalarbeit und die Arbeit von STEIN und MOORE verwiesen werden.

Das vorstehende Verfahren wird von T. H. J. HUISMAN[6] auch zur *Bestimmung der verschiedenen Aminosäuren im Blutplasma* empfohlen. Für das Enteiweißen der Blutproben sind die üblichen Eiweißfällungsmittel ungeeignet; es wird daher das Plasma durch Ultrafiltration bei einem Druck von 200 mm Hg (unter Verwendung eines Gasgemisches aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlensäure) in 24 Std bei 0° von Eiweiß befreit. L. ACKER.

Die bei der spektrophotometrischen Bestimmung der Aminogruppe von Proteinen und Aminosäuren mit Diazoniumverbindungen stattfindenden Reaktionen wurden von D. FRASER und H. G. HIGGINS[7] hauptsächlich für Zwecke der Konstitutionsermittlung unter Verwendung von diazotierter Sulfanilsäure einerseits und Glycin, Lysin, Arginin oder Tryptophan andererseits untersucht. Die aus Glycin und Lysin entstehenden gelben Verbindungen haben ein Absorptionsmaximum bei 363 mμ. Die Farben entwickeln sich allmählich, für Lysin am günstigsten bei p_H 9. Äthanol stört. Das BEERsche Gesetz ist erfüllt. Der molekulare Extinktionskoeffizient beträgt etwa 30000. Bei der Argininverbindung liegt das Absorptionsmaximum bei 356 mμ und der Extinktionskoeffizient ist kleiner als bei Glycin oder Lysin. — *Arbeitsweise.* Man erzeugt das Diazoniumsalz durch Zufügen von 1 ml 1%iger Lösung von Sulfanilsäure in 10%iger Salzsäure zu 1 ml 5%iger $NaNO_2$-Lösung und versetzt mit nicht mehr als 10 ml der Aminosäurelösung. Nach 30 min Stehen bei Raumtemperatur fügt man 3 ml 20%ige Na_2CO_3-Lösung zu, füllt auf 25 ml mit Wasser auf und photometriert. Weitere Untersuchungen der Verff. erstreckten sich auf die Azoderivate von verschiedenen Proteinen, wie Casein, Paracasein, α-Casein, Gelatine, Pepsin, Fibroin und ihrer Säurehydrolysate.

[1] Chem. Techn. **6**, 260—261 (1954). Forsch.-Inst. f. Impfstoffe, Dessau.

[2] ZIMMERMANN, G.: Diese Z. **137**, 161 (1952).

[3] Vgl. ZIMMERMANN, G.: Chem. Techn. **5**, 721 (1953).

[4] Chem. Weekbl. **49**, 109—114 (1953) (Holländisch). Rijks-Univ. Groningen.

[5] Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. **14**, 179 (1950); vgl. diese Z. **136**, 438 (1952).

[6] Chem. Weekbl. **49**, 705—710 (1953) (Holländisch).

[7] Nature (London) **172**, 459—460 (1953). Commonwealth Sci. a. Ind. Res. Organ., Melbourne (Australien).

Die aufsteigende Papierchromatographie von Aminosäuren wurde von M. Milletti[1] modifiziert. Benutzt wird (Abb. 1) ein Reagensglas von 18 / 180 mm, auf dessen Boden sich eine Glasperle und 0,5 ml der fixen Phase oder ein mit der fixen Phase getränkter Wattebausch befindet. 1 ml der beweglichen Phase wird in das kleine Glasgefäß *D* gegeben. Der vom Korkstopfen (*S*) gehaltene Papierstreifen (10 × 190 mm) wird am eintauchenden Ende mit einer Verengung versehen, um den Anstieg der mobilen Phase zu verlangsamen; 30 mm vom untersten Rand wird die Startlinie auf dem Streifen markiert (*A*), 100 mm davon entfernt befindet sich die Marke *B*, die die erforderliche Fronthöhe anzeigt, und in 150 mm Entfernung Marke *B'*, die von der fixen Phase erreicht werden muß und von der beweglichen nicht überschritten werden darf. Die Trocknung des Streifens erfolgt bei Raumtemperatur. Die mit der fixen Phase homogenisierten Streifen werden mit Luftgebläse so getrocknet, daß *A* der Luftaustrittsöffnung entspricht. In die Mitte der Startlinie *A* setzt man 1 oder 2 Tropfen der zu prüfenden 0,5%igen salzsauren Lösung der Aminosäuren (Tüpfeldurchmesser höchstens 2—3 mm) und trocknet sofort mit Warmluft. Als Lösungsmittel dient ein Butanol-Essigsäure-Wassergemisch (4:1:5). Die Entwicklung nimmt man mit 0,5%iger alkoholischer Ninhydrinlösung vor. Anstatt Whatman-Papier Nr. 1 kann auch Cellulose von Sch. & Sch. (am besten jedoch Typ Linters mit 98% α-Cellulose) benutzt werden. Die Folien werden mit dem Messer zu Streifen von 1,5 × 9 × 190 mm mit Spitze an Stelle des Schwalbenschwanzes geschnitten. Die Arbeitstechnik ist die gleiche, nur setzt man auf den Startpunkt wenigstens 10 Tropfen einer 0,1%igen Lösung. Die Entwicklung erfolgt ebenfalls mit Ninhydrin, jedoch muß im Trockenschrank wenigstens 1 Std lang bei 90° C getrocknet werden. Im Falle quantitativer Trennungen wird die Entwicklung mit *Salicylaldehyd* empfohlen. Man gibt 0,5 ml des frisch destillierten Aldehyds in ein Reagensglas, wobei sich der untere Streifenrand etwa 1 cm über dem Flüssigkeitsspiegel befindet. Man läßt die Dämpfe mindestens 2 Std einwirken, worauf man im gewöhnlichen Licht oder filtrierten UV-Licht die Farbflecken markiert. Dann sprüht man mit Wasser, um die gebildeten Schiffschen Basen wieder aufzuspalten. Cellulosestreifen müssen den Salicylaldehyddämpfen viel länger ausgesetzt werden. Die entwickelten Flecken sind gelb, orangefarben oder rot. Die Fluorescenzen sind gelb, himmelblau und blau. Die für die Aminosäuren nach diesem Verfahren erhaltenen R_f-Werte sind sehr genau reproduzierbar.

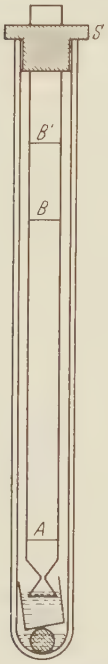


Abb. 1. Vorrichtung zur Papierchromatographie von Aminosäuren von Milletti.

H. Freytag.

Die direkte photometrische Bestimmung von Aminosäuren auf Papierchromatogrammen beschreiben J. de Waal und R. Diaz Cadavieco[2]. 6 cm breite Streifen von Sch. & Sch.-Papier Nr. 2043a werden mit einer Mischung von 50 ml 0,067 m H_3BO_3- und KCl-Lösung + 8,5 ml 0,067 m NaOH-Lösung (p_H 8,4) oder von je 50 ml 0,067 m Na_2HPO_4- und 0,067 m NaOH-Lösung (p_H 12,0) getränkt und bei Raumtemperatur getrocknet, längs einer Linie in 5 cm Abstand vom unteren Papier-

[1] Ann. Chimica **43**, 338—344 (1953). Univ. Cagliari (Italien).

[2] Recueil Trav. chim. Pays-Bas (Amsterdam) **73**, 333—346 (1954). Univ. Utrecht (Holland).

rand mit 13,8 μl der auf p_H 6,2 eingestellten Aminosäurelösung versehen und wieder getrocknet. Für Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glycin, Threonin und Alanin erfolgt die nach bekanntem Verfahren durchgeführte aufsteigende Chromatographierung bei p_H 12,0 mit Phenol, Alanin + Arginin, Tyrosin, Histidin, Valin und Methionin werden bei p_H 8,4 mit m-Kresol, Prolin, Isoleucin und Leucin bei gleichem p_H-Wert mit Benzylalkohol-Butylalkohol (1:1) entwickelt. Die getrockneten Chromatogramme werden mit einer 0,2%igen Lösung von Ninhydrin in eisessighaltigem Aceton besprüht und 15 min auf 80° C erwärmt. Für die Sichtbarmachung von Prolin dient eine 0,2%ige Lösung von Isatin in 4% Eisessig enthaltendem Aceton. Nun werden die Farbflecke planimetriert und in Abständen von je 2 mm ihre Extinktion in Grünlicht von 518 mμ (Prolin bei 589 mμ) ermittelt. Die Auswertung erfolgt nach einem im Original ausführlich beschriebenen Verfahren. Eine Tabelle zeigt, daß die Werte der aus den Hydrolysenprodukten von Albumin aus Rinder- bzw. Pferdeserum abgetrennten Aminosäuren mit den in der Literatur angeführten Zahlen gut übereinstimmen. K. Söllner.

Zur quantitativen Aminosäure-Bestimmung, sowohl in natürlich vorkommenden Gemischen als auch in Eiweißhydrolysaten, bedienen sich E. Hiller und F. Zinnert[1] einer schon früher[2] von ihnen veröffentlichten Methode *unter Auswertung der Chromatogramme mittels des Elphorphotometers*. In 5 Abb. werden die Diagramme der Hydrolysate von Serumalbumin, α_1-Globulin, α_2-Globulin, Keratin und Gelatine gezeigt. Der graphischen Darstellungsweise wird vor der tabellarischen der Vorzug größerer Übersichtlichkeit und des markanten Hervortretens typischer Bestandteile gegeben. Die Diagramme können auch zur quantitativen Auswertung mit dem Planimeter ausgemessen werden. Die Anwendung des Verfahrens auf natürliche Aminosauregemische (z. B. die freien Aminosäuren des menschlichen Serums) liefert gleichfalls befriedigende Ergebnisse. — *Arbeitsweise.* a) Zu untersuchende *Proteine* hydrolysiert man im Einschmelzrohr mit 8 n Salzsäure 24 Std bei 110° C und trägt nach der üblichen Aufarbeitung das Hydrolysat strichförmig[2] in einer Menge auf, die 200—400 μg nicht hydrolysierten Proteins entspricht. — b) *Freie Aminosäuren* (im menschlichen Serum) werden so bestimmt, daß man 2 ml des Serums mit 2 ml 5%iger Trichloressigsäure fällt, die Fällung 30 min im siedenden Wasserbad auf 80—90° C erhitzt und dann durch ein weiches Filter von der aminosäurehaltigen Lösung abtrennt. Das Filtrat engt man auf wenige Milliliter ein und entsalzt in einem Mikroelektrodialysator besonderer Konstruktion 2—3 Std bei 20—25 mA. Die salzfreie Lösung engt man wieder ein und trägt den Rückstand in Form eines schmalen Striches quantitativ auf Streifen von Sch. & Sch.-Papier Nr. 2043 b auf. Die weitere Behandlung erfolgt in üblicher Weise. R. Klockmann.

Eine quantitative Methode zur Bestimmung der Aminosäuren aus der Fleckengröße in zweidimensionalen Papierchromatogrammen entwickelt S. Åkerfeldt[3]. Es wird gezeigt, daß auch für die zweidimensionalen Papierchromatogramme eine logarithmische Beziehung zwischen Konzentration und Fleckengröße gilt. — Die Chromatogramme werden auf Whatman-Papier Nr. 1 oder 4 nach der (geringfügig modifizierten) Methode von R. A. Boissonas[4] gewonnen. Zur Identifizierung werden die Bogen mit Ninhydrinlösung besprüht, die Flecken umrandet und auf homogenes Papier kopiert. Die Flecken werden dann ausgeschnitten, ihre Fläche

[1] Biochem. Z. **324**, 93—95 (1953). Univ. München.

[2] Hiller, E., F. Zinnert u. G. Frese; Biochem. Z. **323**, 245 (1952); vgl. diese Z. **140**, 205 (1953).

[3] Acta chem. scand. (Kopenhagen) **8**, 521—522 (1954). Univ. Stockholm.

[4] Helv. chim. Acta **33**, 1966 (1950); vgl. diese Z. **135**, 208 (1952).

wird durch Wägen bestimmt. Für jede Aminosäure wird eine Konstante ermittelt. Die logarithmische Beziehung zur Errechnung der quantitativen Verhältnisse ist im Original angegeben. HILDEGARD TELSCHOW.

Eine photometrische Analyse von Papierchromatogrammen von *Eiweißhydrolysaten* arbeitete B. KEIL[1] aus. Sie beruht auf der photometrischen Auswertung photographischer Negative der Chromatogramme, die man im reflektierten Licht erhält. Gegenüber den bisherigen Methoden, die in der Photometrie der mit Ninhydrin entwickelten Tüpfel im durchfallenden Licht bestehen[2], besitzt das neue Verfahren den Vorteil, dem durch die ungleichmäßige Papierstruktur bedingten Fehler auszuweichen. Zur Analyse der Zusammensetzung hydrolysiert man das zu untersuchende Eiweiß durch 16stündiges Erhitzen mit 200 Teilen 6 n Salzsäure unter Rückfluß im Ölbad bei 125° C. Das Hydrolysat verdampft man im Vakuum unter wiederholtem Aufnehmen in bidestilliertem Wasser zur Trockne. Zur Überführung von Cystin in Cysteinsäure und Methionin in Methioninsulfon versetzt man 1 Gew. T. Rückstand mit 20 Vol.T. Perameisensäure (1,8 ml 85%ige Ameisensäure + 0,2 ml 26%ige Wasserstoffperoxydlösung), verdünnt nach 20 min mit dem gleichen Volumen bidestillierten Wassers und verdampft zur Trockne. Den Rückstand nimmt man mit Wasser zu einer 0,25%igen Lösung auf, bedeckt sie mit Toluol und bewahrt sie im Kühlschrank auf. Die Lösungen der Aminosäuren (80—100 γg Gemisch) und ein Modellgemisch von Aminosäuren entwickelt man auf Whatman-Papier Nr. 1 absteigend mit Butanol-Essigsäure in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre. Neben die Tüpfel der zu untersuchenden Lösung setzt man noch einen einer 0,1%igen Tropäolin 00-lösung, deren R_f-Wert etwas höher als der von Leucin ist und beim Chromatographieren nicht den unteren Papierrand erreichen darf. Sobald das Lösungsmittel die ganze Länge des Papiers durchwandert hat, wird es im mäßig warmen Luftstrom getrocknet und erneut in gleicher Richtung entwickelt. Derartige 5—8malige Wiederholung führt zu optimaler Trennung der Aminosäuren. Man trocknet das Chromatogramm in ammoniakfreier Atmosphäre und zieht es gleichmäßig durch eine 0,7%ige Lösung von Ninhydrin in wasserfreiem Aceton oder Methyläthylketon. Das feuchte Chromatogramm läßt man 8—10 Std bei Raumtemperatur im Dunkeln in ammoniakfreier Luft trocknen. Nach dieser Zeit, in der die Farbintensität am größten geworden ist, photographiert man das Chromatogramm aus 1,5 m Entfernung auf einen harten Kinofilm und entwickelt ihn mit einem Metol-Phosphat-Borax-Feinkornentwickler 12—15 min bei 20° C. Das Original-Chromatogramm fixiert man mit 1%iger Kupfernitratlösung in Alkohol nach TH. WIELAND und E. KAWERAU[3]. Die Negative mikrophotometriert man und kann die gefundenen Werte graphisch darstellen. Ein Tüpfel von durchschnittlicher Größe wird gewöhnlich von 20 Meßwerten erfaßt. Für das spätere Planimetrieren ist es wichtig, auch die Blindwerte des Negativs zwischen den Maxima und Minima des Chromatogramms auszumessen, wodurch auch der Einfluß der ungleichmäßigen Ausleuchtung des Chromatogramms beim Photographieren ausgeschaltet wird. Die Summe aller Flächen der Chromatogramme der unbekannten Hydrolysate sowie der Aminosäure-Modellgemische bezieht man auf den gleichen Wert und berechnet dann aus den korrigierten Flächenwerten den Aminosäuregehalt der Hydrolysate. Dieses Verfahren gibt um so bessere Werte, je mehr die Zusammensetzung des Hydrolysats der des Modellgemisches entspricht. H. FREYTAG.

[1] Chem. Listy **48**, 725—734 (1954) [Tschechisch]. Akad. Wissensch., Prag.

[2] HILLER, E., F. ZINNERT u. G. FRESE: Biochem. Z. **323**, 245 (1952); vgl. diese Z. **140**, 205 (1953).

[3] Nature **168**, 77 (1951).

Papierelektrophorese von Aminosäuren. D. P. Burma[1] weist darauf hin, daß Aminosäuren sehr eng benachbarter R_f-Werte elektrophoretisch besonders gut getrennt werden können, wenn bei ausgewähltem p_H-Wert das elektrische Feld senkrecht zur Chromatographierrichtung angelegt wird. Ausgehend davon, daß die Wanderung reiner Aminosäuren von ihrer Natur abhängt, d. h. davon, ob saure, basische oder neutrale Aminosäuren gelöst sind, und daß bei Benutzen von Pufferlösungen die Bewegung außerdem vom p_H-Wert und von den isoelektrischen Punkten der Aminosäuren abhängt, erreicht Burma eine besonders starke Differenzierung der R_f-Werte durch folgende elektrochromatographische Methode. Zunächst wird das Papier (40 × 20 cm) mit Citronensäure-Phosphatpufferlösung getränkt, die sorgfältig und gleichmäßig abgequetscht wird. Nach dem Trocknen an der Luft werden 2 cm breite Streifen von kolloidalem Graphit als Elektroden aufgestrichen, deren Homogenität nach dem Trocknen durch Widerstandsmessung überprüft wird. Soll in Richtung der absteigend ausgeführten Chromatographie elektrolysiert werden, dann wird eine Elektrode 1 cm über der Startlinie, die andere am unteren Ende des Papierbogens aufgebracht, soll senkrecht zur Chromatographierrichtung elektrolysiert werden, dann werden die Seiten bestrichen. Elektrolysiert wird mit 220 V unter Kontrolle mit einem Milliamperemeter. Entwickelt wird stets absteigend mit Phenol, das mit der verwendeten Pufferlösung gesättigt ist. Die zahlreichen Ergebnisse an reinen Lösungen von *Asparaginsäure, Ornithin, Glutaminsäure, Cystin, Lysin, α- und β-Alanin und Tyrosin*, sowie an Mischungen der vier zuerst bzw. der vier zuletzt genannten Aminosäuren und bei den p_H-Werten 2,2, 4, 6 und 8, ohne gleichzeitige Elektrolyse, mit Elektrolyse in Chromatographierrichtung (und mit Kathode oder Anode am Start), sowie bei Elektrolyse senkrecht zur Chromatographierrichtung können hier einzeln nicht referiert werden; sie weisen auf außerordentlich zahlreiche Trennmöglichkeiten hin. Die Trennung von Gemischen der Isomeren Valin und Norvalin bzw. Leucin, Isoleucin und Norleucin gelingt offenbar wegen identischer oder nah benachbarter isoelektrischer Punkte nicht. K. Cruse.

Serin und Threonin, sowie *Verbindungen mit benachbarten OH- und NH_2-Gruppen*, lassen sich mit der *1,2*-Dinitrobenzol-Endiolreaktion nachweisen, wie Untersuchungen von W. R. Fearon und W. A. Boggust[2] ergaben. Als Reagentien stellt man eine *gesättigte 1,2-Dinitrobenzollösung* (etwa 0,02%ig) in *kupferfreiem* Wasser her (*Reagens I*) sowie eine 1%ige Natriumhypochloritlösung (*Reagens II*), deren Gehalt an aktivem Chlor gelegentlich überprüft wird, und die nicht stark alkalisch sein darf. – *Ausführung.* Zu 1 ml der neutralen Lösung mit wenigstens 1 mg der Aminosäure fügt man 2 ml Reagens I, 5 Tr. 20%ige Natronlauge und 3 – 6 Tr. Reagens II zu. Man vermischt gut und hält die Reaktionslösung bei Raumtemperatur. Im positiven Falle entwickelt sich langsam binnen 10 min eine Violettfärbung. Ein Kontrollversuch ohne Reagens II soll vorgenommen werden. Bei Abwesenheit störender Substanzen sind freies Serin und Threonin in Konzentrationen von weniger als 1:5000 feststellbar. Im Gegensatz zu Threonin liefert Serin, das reaktionsfähiger gegen Reagens II ist, die Endiolreaktion bei Raumtemperatur in 0,1 n Natronlauge binnen 30 min. Bei Anwesenheit eines Überschusses an anderen Aminosäuren, Aminen, Ammonium-Ionen oder Verbindungen, die mit Hypochlorit reagieren, ist mehr von den beiden Reagentien zuzufügen, Amine mit benachbarten OH- und NH_2-Gruppen, wie *Äthanolamin*, geben die Reaktion ebenfalls. Auch *Harnsäure* reagiert positiv. Lactosefreies Casein, nach Hammarsten gereinigt, gibt keine Reaktion trotz hohem Gehalt an Serin und Threonin. *Gelatine* liefert eine schwache positive Reaktion. Die Störung durch reduzierende Zucker beseitigt man durch

[1] Anal. chim. Acta (Amsterdam) **9**, 518—524 (1953). Bose Res. Inst., Calcutta.
[2] Analyst (London) **79**, 101—102 (1954). Trinity College, Dublin (Irland).

vorangehende Titration mit Fehlings Reagens, die Störung durch Ascorbinsäure und andere starke Endiole mittels Titration mit Jod in schwach saurem Milieu.

H. Freytag.

Über eine neue Farbreaktion des Cysteins mit Salicylaldehyd berichtet G. O. Schlütz[1]. Zur Verwendung gelangt eine Lösung von 5% Salicylaldehyd in 15%iger Natronlauge, die mit Cystein nach Erhitzen im siedenden Wasserbad je nach Konzentration eine orange bis burgunderweinrote Farbe ergibt. Auch Cystin und Glutathion reagieren positiv, nicht dagegen Methionin. Der Nachweis ist nur in Abwesenheit von Aceton brauchbar.

K. Hinsberg.

Eine UV-spektrophotometrische Bestimmungsmethode von Tyrosin und Tryptophan in Proteinlösungen und Gewebeschnitten beschreiben V. Ja. Brodskij und I. M. Limarenko[2]. Für die Trennung der aromatischen Aminosäuren wird die für diese unspezifische Reaktion mit HNO_2 angewandt, die unter milden Bedingungen außer zur Desaminierung auch zum Nitrieren des Benzolringes, sowie zur Kondensation der Ringe, oder zu anderen Veränderungen der Moleküle dieser Aminosäuren führen können. Derartige Veränderungen können auch auf die Absorption dieser Aminosäuren nachwirken. Zuerst wird die Absorption spektrophotometrisch in reinen alkoholischen 0,01%igen Aminosäurelösungen (Arginin, Histidin, Cystein, Methionin, Valin, Alanin, Glutaminsäure, Leucin, Lysin, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) gemessen. Nach 1½ Std Einwirkung von 0,2 g HNO_2 ($NaNO_2$ – CH_3COOH) bei 40° C zeigt sich, daß die HNO_2-Einwirkung nur die Absorptionsspektren von den aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin) verändert. Tryptophan zeigt außerdem ein zweites Absorptionsmaximum bei 310 mμ, wobei das erste Maximum (in alkalischer Lösung bei 280 mμ) eine Erniedrigung auf 270 mμ erfährt, sowie beim Tyrosin von 290 mμ auf 390 mμ sich erhöht. Das Absorptionsspektrum vom Phenylalanin ändert sich unwesentlich; es zeigt sich ein unbedeutendes Maximum bei 350 mμ. Für die UV-Mikroskopie, bei der die Absorption nach Photoaufnahmen beurteilt wird, führten die Verff. solche Versuche durch, bei denen der Einfluß der Reaktionszeit, der Temperatur und der Konzentration der HNO_2 auf die Veränderung der Absorptionsspektren der aromatischen Aminosäuren festgestellt werden kann. Die Resultate sind folgende: 1. Beim *Tyrosin* in 0,2%iger salpetriger Säure und bei 40° C tritt das zweite Absorptionsmaximum (390 mμ) in 5 min auf; in 1%iger HNO_2 ist die Absorption der UV-Strahlen in beiden Maxima viel ausgeprägter, besonders auch bei einer Temperatur von 50° C. Allgemein ist die Absorption proportional der Reaktionszeit, der Temperatur und der Reagenskonzentration. — 2. Beim *Tryptohan* tritt in allen Fällen ein charakteristischer scharfer Absorptionsabfall bei 320 mμ ein. Bei 400 mμ nähert sich die Kurve dem Nullpunkt. — 3. Die Absorption von *Phenylalanin* ändert sich nur geringfügig. Weiter haben die Verff. die Absorption der Eiweiße von Gelatine (enthält kein Tyrosin und Tryptophan), Histonen (enthält kein Tryptophan, sondern Tyrosin) und Casein (enthält Tryptophan und Tyrosin) bei obigen Bedingungen untersucht. Die Absorptionskurve der Gelatine ändert sich bei der Reaktion mit HNO_2 nicht. Bei Histonen zeigt die Tyrosinkurve ein zweites Absorptionsmaximum bei 400 mμ. Im Casein treten zwei deutliche Maxima auf: Tryptophan bei 290 mμ und Tyrosin bei 400 mμ. Die Verff. vermuten, daß auch ein histologisches Präparat in Reaktion mit HNO_2 die Verteilung von Tryptophan und Tyrosin im Gewebe anzeigen kann. Beim Photographieren eines solchen Präparates mit Filter 313 mμ kommt das Tryptophan zum Vorschein (die Absorption des

[1] Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **293**, 48 (1953). Univ. Freiburg Br.

[2] Dokl. Akad. Nauk SSSR. N. S., **95**, 313—316 (1954) [Russisch]. Staatliche Univ. M. V. Lomonosov, Moskau.

Tryptophans ist 5–10mal größer als die des Tyrosins). Bei hoher Temperatur und längerer Reaktionsdauer (30 min bis 2 Std, 1%ige HNO_2-Lösung, 50° C) ist mit Filter 390—410 mμ das Tyrosin bestimmbar. Eine Mikrophotographie illustriert die Verteilung von Tyrosin und Tryptophan in den Nervenzellen eines Kaninchens.

Martha Wildau.

Zur Mikrobestimmung von Tryptophan verwenden J. Kawamata, T. Takahashi und M. Yachiku[1] das Verfahren von A. C. Bratton und E. K. Marshall[2] für Sulfonamide, ersetzen aber das Diazoreagens dieser Autoren durch das Reagens von Tsuda. – *Ausführung.* Man bringt je 1 ml 2 n Salzsäure und 1%ige $NaNO_2$-Lösung zu 1 ml der Probe, die sich in einem graduierten Rohr mit Glasstopfen befindet, läßt 30 min bei 30° C in einem Wasserbad stehen und fügt dann 4 ml 4%ige Ammoniumsulfaminatlösung hinzu. Nach 10 min versetzt man mit 3 ml 0,2%iger 1-(β-Diäthylaminoäthylamino)-naphthalinoxalatlösung. Die sofort entstehende Rotfärbung erreicht bei 30° C nach 15–30 min ihr Maximum und bleibt dann 60 min unverändert. Man mißt nach 30 min bei 30° C im Pulfrich-Photometer mit Filter S 55. 0,005 bis 0,250 mg Tryptophan können genau erfaßt werden. Es stören Kynurerin, Anthranilsäure und Abrin. Andere Aminosäuren geben die Reaktionen nicht.

H. Kurtenacker.

Zur photometrischen Bestimmung von Lysin, Tyrosin und Arginin haben J. P. Zalta und Y. Khouvine[3] die bisherigen Arbeitsvorschriften so umgestaltet, daß die neuen Methoden rasche und sehr empfindliche Ermittlungen gestatten. — *Arbeitsverfahren.* 1. *Lysin* wird nach dem Prinzip von Nelson, McFarlan und Boulet[4] bestimmt. Eine Testreihe mit 5–30 μg Lysin (von einer neutralisierten Stammlösung mit 100 μg ml) sowie die Probelösungen ergänzt man auf jeweils 0,50 ml, fügt 0,25 ml 0,1 n Salzsäure, dann 1 ml 1%ige Chloramin T-lösung zu, läßt 15 min unter häufigem Schütteln stehen, versetzt mit 0,25 ml 4%iger Kaliumarsenitlösung, erwärmt 5 min auf einem Wasserbad von 70° C, gibt 2,5 ml eines Gemisches von 10 ml 2%iger Natriumveronallösung und 5 ml Reagens (0,5 g NH_4-Molybdat + 1 g Na-Wolframat + 10 ml Wasser + 0,5 g Na-Arsenat, 2–3 min erhitzen, + 4 ml 5 n Salzsäure, 10 min erhitzen, 1 : 10 verdünnen; 2—3 Tage haltbar) hinzu, versetzt nach 15 min mit 0,5 ml 6%iger Natriumveronallösung und photometriert nach weiteren 15 min (Rotfilter). Die Färbung ist wenigstens 1 Std haltbar. 7–30 μg Lysin sind bis auf 5% genau bestimmbar. Histidin stört; eine Korrektur ist jedoch durch eine entsprechende Eichkurve möglich. — 2. *Tyrosin.* Diese Bestimmung beruht auf der Reaktion von O. Gerngross, K. Voss und A. Herfeld[5]. Eine Standardreihe sowie die Anteile der Probelösungen ergänzt man wie oben auf 0,5 ml, versetzt dann nacheinander mit 0,5 ml konz. Salzsäure, 0,25 ml reiner Phosphorsäure, 0,10 ml Salpetersäure (1 : 10) und 0,50 ml α-Nitroso-β-naphthollösung (100 mg in 98 ml Wasser + 2 ml 40%ige Natronlauge), wobei man nach jeder Zugabe schüttelt, erhitzt 4 min auf dem Wasserbad auf 70° C, kühlt ab, ergänzt auf 5 ml mit Salzsäure (1 : 2) und photometriert binnen $^1/_2$ Std (Grünfilter). 30 μg Tyrosin sind mit 3% Genauigkeit erfaßbar. 3. *Arginin.* Die Bestimmung beruht auf der Reaktion von S. Sakaguchi[6], in enger Anlehnung

[1] Med. J. Osaka Univ. **5**, 393–396 (1953) [Japanisch] (nach engl. Zus. fass. refer.)

[2] J. biol. Chemistry **128**, 537 (1939); vgl. auch diese Z. **135**, 464 (1952); **137**, 69 (1952/53).

[3] Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **35**, 697—701 (1953). Inst. Biol. phys.-chim. C. N. R. S., Paris.

[4] Fed. Proc. **5**, 148 (1946).

[5] Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 435 (1933).

[6] J. Biochemistry (Tokyo) **5**, 133 (1925).

an die Methode von Dumazert und Poggi[1]. Eine Reihe von 5 –20 µg-Anteilen einer Argininstammlösung (100 µg/1 ml) sowie die Prüflösungen, deren Mengen 0,2 ml nicht überschreiten dürfen, versetzt man mit 0,10 ml α-Naphthollösung (0,25 g in 25 ml Alkohol), fügt nach 2 min 0,75 ml 2%ige wäßrige Urethanlösung und 0,75 ml Natriumhypobromitlösung (0,9 ml Br_2 in 100 ml 10%iger Natronlauge), hinzu, schüttelt 3—4 sec kräftig, verdünnt rasch mit 96 Vol%igem Alkohol auf 10 ml und photometriert nach 10 min unter Benutzung eines Grünfilters gegen eine Blindlösung. Die Färbung ist wenigstens 1 Std beständig. Die Genauigkeit beträgt etwa 3%. Die verwendeten Reagentien sind im Eisschrank 3—4 Tage haltbar.

H. Freytag.

Die chromatographische Bestimmung von Glutaminsäure in Proteinhydrolysaten wurde eingehend von W. Wetzel[2] untersucht. Unter kritischer Berücksichtigung der in der Literatur angegebenen Verfahren wird folgende *Arbeitsweise* empfohlen. Etwa 50 g Probe (entsprechend etwa 500 mg Glutaminsäure) werden mit 300 ml 20%iger Salzsäure 15–20 Std am Rückfluß hydrolysiert. Das filtrierte Hydrolysat wird bis zur sirupartigen Konsistenz abgedampft, in Wasser aufgenommen und auf 1 l aufgefüllt. 100 ml werden erneut abgedampft und im Ölpumpenvakuum (1—2 mm Hg) im Exsiccator über NaOH scharf getrocknet. Dann wird mit 50 ml 5%iger Essigsäurelösung aufgenommen und die Lösung bei 60° C mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 10–12 Tr. je Minute wird durch über einer Glasfritte (11 G 3) befindliche Aktivkohle filtriert, die zuvor 10—15 min mit 20%iger Essigsäure (300 ml je 10 g Carboraffin) gekocht, mit 1 l kochendem Wasser gewaschen, in wäßriger Suspension ebenfalls bis zur Sättigung mit Schwefelwasserstoff behandelt, dann auf die Fritte aufgebracht und mit 150 ml 5%iger mit Schwefelwasserstoff gesättigter Essigsäure vorbehandelt war. Das Kohlepolster wird, ohne daß es trocken läuft, mit 300 ml 5%iger Essigsäure nachgewaschen. Das wasserklare Filtrat wird eingeengt, erst im Trockenschrank (Vakuum-), dann bei Ölpumpenvakuum im Exsiccator über NaOH scharf getrocknet, in Wasser aufgenommen und auf 100 ml aufgefüllt. 10 ml dieser Lösung werden chromatographiert. Hierzu werden 25 g Aluminiumoxyd nach Brockmann mit 50 ml 1n Salzsäure übergossen und nach 5 min auf einer Glasfritte abgesaugt. Sodann wird gewaschen, bis das Filtrat p_H 2,5—2,8 zeigt. Dieses Aluminiumoxyd wird mit Salzsäure vom gleichen p_H-Wert in die Säule gebracht (250 mm lang, 17,5 mm breit). Sie wird mit 75 ml Schwefelwasserstoffwasser beschickt, das abfiltriert und verworfen wird. Auf die Säule wird dann die Lösung gegeben, die zuvor noch mit 1–2 Tr. Methylrot versetzt, bis zum Umschlag mit 30%iger Natronlauge neutralisiert und dann mit verdünnter Natronlauge auf p_H 5,5–6,0 eingestellt worden ist. Mit 1 Tr. je Sekunde wird filtriert. Dann wird mit 100 ml Wasser, mit 100 ml Schwefelwasserstoffwasser und wieder mit 50 ml Wasser gewaschen, wodurch alle Begleitaminosäuren entfernt werden. Glutaminsäure wird anschließend mit 250 ml 0,5 n Essigsäure eluiert. 50 ml Wasser werden nachgeschickt. Nach Eindampfen des Eluats wird auf 100 ml aufgefüllt und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt (Titration mit 0,1 n bzw. 0,02 n Schwefelsäure). — Untersuchungen nach dieser Methode an Hydrolysaten von Seide, Weizenkleber, Maiskleber, Casein und Horn stimmen mit Literaturdaten und enzymatisch-manometrischen Bestimmungen von K. Hasse und H. W. Schuhmacher[3] gut überein. Zugesetzte Glutaminsäure wird zu 99% wiedergefunden.

K. Cruse.

---

[1] Bull. Soc. Chim. biol. **21**, 1381 (1939).

[2] Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **96**, 237—244 (1953). ETO, Nahrungsmittelfabr. R. Graebener, Ettlingen.

[3] Diese Z. **137**, 433 (1952/1953).

Für die quantitative photometrische Bestimmung von Prolin (I) und Pipecolinsäure (II) mittels Ninhydrin gibt R. S. SCHWEET[1] folgende Vorschrift. *Reagentien:* A. 372 mg Ninhydrin werden in 20 ml Eisessig frisch gelöst. B. 1 ml konz. Salzsäure wird mit 99 ml Eisessig gemischt. – *Arbeitsweise.* Die 1,5—10 μg *Prolin* enthaltende Lösung wird in einem Reagensglas von 18 × 150 mm genau auf 0,05 ml ergänzt, mit 0,2 ml Lösung B versetzt und mit Eisessig auf 3,85 ml aufgefüllt. Schließlich werden 0,3 ml Lösung A zugefügt und das mit einer Aluminiumkappe verschlossene Glas völlig eingetaucht in einem Glycerinbad von 121—122° C genau 5 min lang erhitzt. Nach Kühlen mit Eis auf Raumtemperatur wird mit Eisessig auf ein von der Farbintensität der Reaktionslösung abhängiges Volumen ergänzt und die Extinktion der Lösung bei 530 mμ gemessen. Als Vergleich dient eine 10^{-4} m-Lösung von I in Eisessig. – *Die Bestimmung von Pipecolinsäure* erfolgt analog, nur wird die Analysenlösung mit Eisessig auf 3,95 ml ergänzt und es wird nur 0,2 ml Lösung A zugesetzt. Nach 8 min langem Erhitzen wird gekühlt und die Extinktion dieser Lösung nach entsprechender Verdünnung mit Eisessig bei 560 mμ ermittelt. Da das Absorptionsmaximum von I bei 530 mμ, das von II bei 560 mμ liegt (Diagramm im Orig.), können beide Substanzen auch nebeneinander bestimmt werden. Die Analysentechnik wird im Original ausführlich dargelegt. Ebenso beschreibt Verf. ein Verfahren, I und II in Anwesenheit verschiedener α-Aminosäuren (Eiweißhydrolysate) zu ermitteln, die durch Amberlite IR-4B entfernt werden können.

K. SÖLLNER.

Zur quantitativen Bestimmung von Oxyprolin in Eiweißhydrolysaten wird von D. MÜTING[2] das Verfahren nach K. LANG[3] in der Modifikation nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und S. AKABORI[4] abgeändert. Es wurde versucht, durch verschiedene Oxydationsmittel ohne anschließende Destillation geeignete Werte zu erhalten. Als bestes Mittel erwies sich Hypobromit, wobei der Überschuß durch Natriumthiosulfat, Natriumsulfit oder Glucose zerstört wird. — *Arbeitsvorschrift.* Zu 1 ml Säurehydrolysat (entsprechend 1—50 μg Oxyprolin) gibt man 1,0 ml Hypobromitlösung (1,8 ml Brom + 500 ml 5%ige Natronlauge), schüttelt und versetzt nach 2 min tropfenweise mit 0,1 n Natriumthiosulfatlösung (oder auch mit 20%iger Na_2SO_3- oder 50%iger Glucoselösung), bis Entfärbung eingetreten ist (meist 2 Tr.). Anschließend wird 1,0 ml 2%ige p-Dimethylaminobenzaldehydlösung in 20%iger Salzsäure (EHRLICHS Reagens) zugefügt, gemischt und genau 2 min in ein siedendes Wasserbad gestellt. Es erfolgt eine maximale Entwicklung einer rotvioletten Farbe, die nach Abkühlen im Stufenphotometer bei Filter S 50 gegen den Leerwert ausgemessen wird. So wurde in Gelatine ein Gehalt von 14,2% Oxyprolin festgestellt (M. BERGMANN und W. H. STEIN[5] fanden 14,4%). Im menschlichen Serum wurde ein Wert von 0—0,2% gefunden.

E. BAERTICH.

Zur Bestimmung von Kreatinin verwendet J. J. CARR[6] das colorimetrische Verfahren von S. R. BENEDICT und J. A. BEHRE[7], bzw. A. BOLLIGER[8], das auf der Farbreaktion mit Natriumdinitrobenzoat in alkalischer Lösung beruht. Die maximale Beständigkeit der granatroten Kreatinin-Dinitrobenzoat-Additionsverbindung

[1] J. biol. Chemistry **208**, 603—613 (1954). Inst. Technol., Pasadena, Calif. (USA).

[2] Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **291**, 234—235 (1953). Forsch.-Inst. Diabetes, Karlsburg und Forsch.-Inst. Tierseuchen, Insel Riems.

[3] Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **219**, 148 (1933).

[4] Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **224**, 187 (1934); vgl. diese Z. **105**, 304 (1936).

[5] J. biol. Chemistry **128**, 217 (1939).

[6] Analyt. Chemistry **25**, 1859—1863 (1953). Univ. New York (USA).

[7] J. biol. Chemistry **114**, 515 (1936); vgl. diese Z. **119**, 384 (1937).

[8] J. Proc. Roy. Soc. New South Wales **69**, 224 (1936), vgl. diese Z. **120**, 34 (1940).

wird bei einem p_H-Wert bis zu 11,7 in 0,025 m Reagenslösung erreicht, bei Kreatinin-Konzentrationen, die einer Molarität von etwa $1 \cdot 10^{-3}$ entsprechen. Die maximale Empfindlichkeit und minimale Stabilität wurde bei 0,2 m Natriumhydroxyd und 0,2 m Reagenslösung gefunden, anwendbar auf $1 \cdot 10^{-5}$ m Kreatininlösungen. Die Bestimmung erfolgt mit 10 ml der neutralen Probenlösung, der 2 ml Reagenslösung zugefügt werden. Diese ist stets frisch herzustellen. Man vermischt hierzu gleiche Volumina 0,300 m Natronlauge und einer Lösung von 6,36 g 3,5-Dinitrobenzoesäure und 1,59 g wasserfreiem Natriumcarbonat in 100 ml Wasser (0,300 m). Die Blindprobe besteht aus 10 ml Wasser und 2 ml Reagenslösung. Die Vergleichslösung stellt man durch Zugabe von 2 ml Reagens zu 10 ml einer Standardlösung dar, die in dieser Menge 0,6 mg Kreatinin enthält. Man vermischt alle Lösungen und beläßt sie 1 Std in den verschlossenen Reagensgläsern in einem Wasserbad von 25° C, mißt die Absorption bei 500 mμ der Standard- und zu prüfenden Lösung gegen die Blindprobe und berechnet die Kreatininkonzentration aus dem Verhältnis dieser beiden Absorptionswerte. Es lassen sich so 0,1—1,0 mg Kreatinin in 10 ml Flüssigkeit bestimmen (das Beer-Lambertsche Gesetz ist erfüllt). Der Fehler ist kleiner als 1%. H. Freytag.

Bei der Kreatininbestimmung mit Hilfe der Jaffé*schen Reaktion* erhält man nach den Angaben von G. R. Hervey[1] eine lineare Eichkurve, wenn die Ablesung bei 520 mμ im Beckman-Spektrophotometer erfolgt. Diese Wellenlänge wird empfohlen, obschon bei kürzerer Wellenlänge die Empfindlichkeit größer ist. Zu beachten ist noch, daß die Glasgefäße nicht mit Aceton gespült werden. Die Standardlösung von Kreatinin-Zinkchlorid ist in 0,1 n Salzsäure nur einige Wochen bei Raumtemperatur haltbar, längere Zeit dagegen unter Toluol im Eisschrank. Für Einhaltung konstanter Bedingungen bezüglich Temperatur usw. ist Sorge zu tragen. Es wird das Reagens von R. W. Bonsnes und H. H. Taussky[2] empfohlen. K. Hinsberg.

E. E. Mandel und F. L. Jones[3] stellten vergleichende Untersuchungen über die Methoden zur *Bestimmung von Keratinin* an. Die ursprünglich von O. Folin[4] zur Bestimmung in Blut und Harn eingeführte Methode, die später mannigfache Änderungen erfuhr, beruht auf der Jaffé*schen* Reaktion. Die zu hoch gefundenen Werte für Kreatinin können damit erklärt werden, daß im Blut, vor allem in den Erythrocyten, noch andere Substanzen vorhanden sind, die gleichfalls die Jaffé*sche* Reaktion geben. Die Farbreaktion mit 3,5-Dinitrobenzoesäure in alkalischer Lösung nach A. Bolliger[5] ist spezifischer als die Jaffé*sche* Reaktion mit alkalischer Pikratlösung, weil die bekannten störenden Substanzen, die gleichfalls mit dem Reagens eine Rotfärbung geben, eine relativ geringere Farbintensität entwickeln, demnach kleinere Kreatininwerte ergeben als mit der Pikratmethode. Die Art der Enteiweißung spielt eine große Rolle. Die Verf. bestätigen, daß von den allgemein angewandten Enteiweißungsreagentien die Trichloressigsäure besonders geeignet ist. Bei Vorhandensein eines ausgesprochen sauren Filtrates ist auch Wolframsäure mit gutem Erfolg anwendbar. — Die von R. W. Bonsnes und H. H. Taussky[6] vorgeschlagene direkte Pikratmethode ergab relative Fehler von 18—31% des Keratiningehaltes im Normalserum. Die einzelnen Methoden werden von den Verff. genau beschrieben. E. Baertich.

[1] Nature (London) **171**, 1125 (1953). Dptm. Exper. Med., Cambridge (England).

[2] J. biol. Chemistry **153**, 581 (1945).

[3] J. Lab. clin. Med. **41**, 323 334 (1953). Federal Secur. Agency and Emory Univ. Atlanta, Ga. (USA).

[4] J. biol, Chemistry **17**, 463 (1914); vgl. diese Z. **55**, 509 (1916); O. Folin und H. Wu: J. biol. Chemistry **38**, 81 (1919).

[5] Med. J. Australia **2**, 818 (1936); vgl. auch das vorstehende Referat.

[6] J. biol. Chemistry **158**, 581 (1945).

Zur Kreatininbestimmung mit Kaliumquecksilberrhodanid und Dithizon hatten P. Stelgens, H. Wolf und K. Schreier[1] früher eine neue Methode beschrieben. P. Stelgens[2] berichtet jetzt über die damit gesammelten Erfahrungen, besonders bezüglich des Reaktionsmechanismus. Die Farbreaktion des Kreatinins mit Di- und Trinitroverbindungen aromatischer Kohlenwasserstoffe, also z. B. Pikrinsäure, scheint sich grundsätzlich von der Reduktionsreaktion mit anorganischen Quecksilberverbindungen zu unterscheiden. Kaliumquecksilberrhodanidlösung gibt in alkalischem Medium mit Kreatinin einen grauschwarzen Niederschlag, der in verd. Säuren unlöslich ist. Verwandte Verbindungen wie Kreatin, Glykocyamin, Methylguanidin, Guanidin und Harnstoff, die mindestens über ein freie Aminogruppe verfügen, bilden dagegen weiße Niederschläge, die in Säure löslich sind, ebenso auch Harnsäure. Für die Bestimmung des Kreatinins sind die Laugenendkonzentration, die Reinheit der Dithizonlösung und die Zusammensetzung des Quecksilberreagenses wesentlich. Der Verf. gibt eine eingehende Vorschrift, für die eine Standardlösung gebraucht wird. Hierzu wird Kreatinin nach Towles und Voegtlin[3] gereinigt. Zur *Bestimmung* bringt man 4 ml Kreatininlösung auf 9,5 ± 0,5° C und setzt 1 ml Natronlauge und dann 1 ml Quecksilberreagens (70 μg Hg/ml; 7% Rhodanüberschuß) zu. Nach 30 min säuert man mit 10 ml n Schwefelsäure an, füllt unter Nachspülen mit 23 ml Wasser in gut verschließbare Glasflaschen, gibt 1 ml 20%ige Hydroxylaminlösung und 10 ml Dithizon-Chloroformlösung (3 mg-%) zu und schüttelt 1 min kräftig. Dann läßt man mindestens 20 min stehen und mißt die Extinktion der organischen Schicht am Stufenphotometer mit Filter S 50. Der Leerwert soll eine Extinktion von 0,95 und 1,02 besitzen. Die Beziehung zur Extinktion ist bis 12,5 μg Kreatinin linear. Die Streubreite ist bei 2,5 μg mit 10%, bei 10 μg mit 2,5% angegeben. Die Empfindlichkeit der Methode ist wesentlich größer als bei der Pikrinsäure- und Dinitrobenzoesäurereaktion. Man muß aber darauf achten, daß während der alkalischen Reaktion kein Hydroxylamin zugegen ist. — Für die Überführung von Kreatin in Kreatinin werden die verschiedenen Methoden durchgesprochen. Für Harn wird vorgeschlagen, eine Menge zu nehmen, die bis zu 15 μg Kreatin enthält und wie folgt zu verfahren: Man füllt auf 4 ml auf, gibt 1 ml 1%ige Salzsäure zu, kocht 3 Std im siedenden Wasserbad, neutralisiert nach dem Abkühlen mit 0,5 ml einer der Salzsäuremenge entsprechenden Natronlauge, versetzt bei 9,5° C mit 1,5 ml 6 n Natronlauge, 1 ml Quecksilberreagens und nach 30 min mit 13 ml 1 n Schwefelsäure und verfährt dann weiter wie oben beschrieben. K. Hinsberg.

Zur Bestimmung von oxydiertem Glutathion in Gemischen mit Cystin weisen W. Stricks und I. M. Kolthoff[4] darauf hin, daß die Spaltung oxydierten Glutathions in alkalischer Lösung durch Zugabe von Quecksilber(II)-salz zum vollständigen Ablauf gebracht werden kann, so daß auf diese Weise eine amperometrische Bestimmung auch bei Gegenwart großer Cystinmengen möglich wird. Soll auch der Cystingehalt ermittelt werden, so kann nach Entfernung des Quecksilberglutathionats, des Quecksilbersalzüberschusses mit Thionalid und des Thionalidüberschusses mit o-Dichlorbenzol auch Cystin direkt kathodisch polarographiert werden. — *Arbeitsweise.* 40 ml einer Lösung, die 0,1 m an Natriumnitrat, 0,1 m an Ammoniak und 0,006—0,02 m an Natriumhydroxyd ist, werden mit eingesetzter Platindrahtelektrode (1800 U/min) mittels Stickstoff sorgfältig von Sauerstoff befreit. Unter strömendem Stickstoff gibt man sodann so viel Probe-

[1] Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **286**, 218 (1950).
[2] Biochem. Z. **323**, 480—488 (1953). Univ. Heidelberg.
[3] J. biol. Chemistry **10**, 479 (1911).
[4] Analyt. Chemistry **25**, 1050—1057 (1953). Univ. Minneapolis, Minn. (USA).

lösung zu, daß die Mischung etwa $2 \cdot 10^{-5}$ bis 10^{-4} Mole oxydiertes Glutathion im Liter enthält. Nach Einsetzen der Elektrolytbrücke zur gesätt. Kalomelelektrode und der Mikrobürette, deren Spitze in die Lösung eintauchen soll, wird bei —0,3 bis —0,4V mit 10^{-3} m Sublimatlösung in der Weise amperometriert, daß nach jeder Zugabe Stromkonstanz abgewartet wird (1—2 min). Auch bei 20fachem Cystinüberschuß sind die Ergebnisse auf $\pm$ 3% genau. In einer gesonderten Probe können oxydiertes Glutathion und Cystin gemeinsam in ammoniakalischer Lösung (pH 9) mit Kupferlösung in bekannter Weise amperometriert werden. — *Zur Polarographie des Cystins* werden 0,2 ml 5 m Natriumnitratlösung und 0,1—0,15 ml 2 m Natronlauge, mit 9 ml Wasser vermengt, durch Stickstoff von Sauerstoff befreit und nach Zugabe der Probelösung (bis zu etwa 10^{-3} m oxydiertes Glutathion enthaltend) mit einem 6—8%igen Überschuß 0,05 m Sublimatlösung versetzt. Nach Durchlüften mit Stickstoff über weitere 5 min wird der Quecksilberüberschuß durch Zugabe von 0,6 ml frischer 2%iger Thionalidlösung in Eisessig gefällt. Bei laufendem Stickstoffstrom wird dann mit 5 ml o-Dichlorbenzol auch das Thionalid gefällt. Nach 5 min wird immer unter Stickstoffatmosphäre an der Tropfelektrode ($m^{2/3}\, t^{1/6} = 1{,}748$, 80 cm Hg-Säule) zwischen — 0,7 und — 1,2 V polarographiert. Zur Auswertung wird der Diffusionsstrom auf — 0,8 V graphisch extrapoliert. Er ist, um die Volumänderungen korrigiert und auf 10 ml Probelösung bezogen, maßgebend für die Konzentration. — Cystin und oxydiertes Glutathion können *polarographisch auch gemeinsam* auf Grund der Beobachtung analysiert werden, daß oberflächenaktive Substanzen, wie z. B. Thymol die Cystinwelle zu negativeren Potentialen verschieben, diejenige des Peptids aber nicht. Hierzu werden am besten 2 ml 1 m Essigsäure und 2 ml 1 m Kaliumchloridlösung mit so viel Probelösung versetzt, daß das Gemisch mindestens $5 \cdot 10^{-4}$ Mol, jedoch nicht mehr als $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ Mol Disulfid im Liter enthält. Nach Auffüllen auf 20 ml und Durchlüften mit Stickstoff werden 0,6—0,7 ml einer gesättigten Thymollösung ($5{,}66 \cdot 10^{-3}$ m bei 20° C) zugesetzt (entsprechend maximal $7 \cdot 10^{-4}$ Mol oxydiertes Glutathion). Man läßt noch 1 min Stickstoff strömen und bestimmt dann unter Stickstoff die Diffusionsströme bei — 0,5 und — 0,9 V. Oxydiertes Glutathion wird hierbei auf 5% genau, Cystin bei Konzentrationen über $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ m auf 3%, bei kleineren Mengen nur auf 6% genau erfaßt. K. Cruse.

Zur Bestimmung carboxylendständiger Aminosäuren von Peptiden führen W. Grassmann, H. Hörmann und H. Endres[1] die nach Veresterung, Reduktion mit Lithiumborhydrid und saurer Hydrolyse erhaltenen Aminoalkohole und Aminosäuren in die N-Dinitrophenyl (DNP)-Verbindungen über, trennen die DNP-Aminoalkohole ab (Extraktion mit Äther aus hydrogencarbonathaltiger Lösung) und bestimmen sie papierchromatographisch. Drei verschiedene Lösungsmittel-

R_f-*Werte einiger DNP-Aminoalkohole.*

DNP-Aminoalkohol	Lösungsmittelgemisch		
	1*	2*	3
— Leucinol	1,00	1,00	0,86
— Valinol	0,68	0,64	0,77
— Phenylalaninol	0,51	0,54	0,82
— Prolinol	0,31	0,37	0,65
— Alaninol	0,25	0,34	0,53
— Colamin (-Glycinol)	0,12	0,05	0,29

* Bezogen auf DNP-Leucinol.

[1] Chem. Ber. 86, 1477—1482 (1953). Max-Planck-Ges., Regensburg.

gemische haben sich hierfür als brauchbar erwiesen: 1. Dekalin-Eisessig-Isoamylalkohol (15:10:2), 2. Dekalin-Eisessig-Nitrobenzol (9:6:1), 3. Dekalin-10%ige-Essigsäure-Isoamylalkohol (15:10:4). Die R_f-Werte einiger DNP-Aminoalkohole sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen. H. Freytag.

---

3. Auf gerichtliche Chemie bezügliche Methoden.

Die Analyse nach dem Verfahren von Stas-Otto zur Auffindung von Giften modifizierten M. Feldstein und N. C. Klendshoj[1]. — *Arbeitsweise.* Etwa 500 g zerkleinertes Gewebe destilliert man mit Dampf aus saurer Lösung, sammelt 500 ml Destillat und prüft in üblicher Weise auf flüchtige Bestandteile einschließlich Alkohol. Den Rückstand filtriert man, suspendiert das Unlösliche in 500 ml siedendem Wasser, filtriert wieder und vereinigt die Filtrate. Einen aliquoten Teil davon behandelt man in einem Flüssigkeitsextraktionsapparat, ähnlich dem von E. B. Hershberger und S. K. Wolfe[2], 2 Std mit Chloroform, trocknet den Auszug mit Na_2SO_4 mehrere Stunden lang, destilliert bis auf 50 ml ab und bringt auf dem Dampfbad zur Trockne. Die Gifte der 2. Gruppe (Barbiturate, Salicylate, Phenacetin, Acetanilid usw.) bleiben als Rückstand und werden wie üblich nachgewiesen. Die nach der Chloroformextraktion zurückbleibende, wäßrige Flüssigkeit macht man mit Natronlauge lackmusalkalisch, extrahiert mit Chloroform und verfährt wie oben. Man erhält Verbindungen wie z. B. Codein, Atropin, Strychnin usw. Die bei Isolierung der 3. Gruppe verbleibende wäßrige Flüssigkeit macht man mit verdünnter Salzsäure lackmussauer, dann alkalisch mit Ammoniak, extrahiert mit einem Gemisch aus Chloroform und Isopropylalkohol (5 : 1) und verfährt wie schon beschrieben. Man erhält dadurch z. B. Morphin (4. Gruppe). Die Schwermetalle (Gruppe 5) findet man, indem man zuerst 100 g zerkleinertes Gewebe 12 Std auf dem Dampfbad mit 200 ml HNO_3 behandelt, nach dem Abkühlen durch Glaswolle filtriert, nach Zugabe von 5 ml konz. Schwefelsäure bis zum Verkohlen abdestilliert und vorsichtig mit einem Gemisch aus Salpetersäure und Perchlorsäure (3 : 1) bis zur völligen Oxydation versetzt. Man destilliert bis zum Auftreten von Schwefelsäuredämpfen. Nach dem Abkühlen fügt man 10 ml dest. Wasser zu und destilliert erneut bis zum Rauchen. In dieser Lösung sind dann die wie üblich nachweisbaren Schwermetalle enthalten. Die Anionen (6. Gruppe) weist man in der Gewebeasche (gewonnen bei 600° C) nach. Zum Nachweis von Nitrit und Chlorat werden die Gewebe gegen dest. Wasser dialysiert und das Dialysat im Vakuum bei 50° C eingeengt. H. Freytag.

Um in Kriminalfällen von Bleigeschossen herrührende Bleispuren auf Holz, Papier u. ä. nachzuweisen, empfiehlt A. Caldas[3] die Tüpfelreaktion mit Natriumrhodizonatlösung (2 mg in 1 ml Wasser). Ist das Substrat farblos oder schwach gefärbt, prüft man unmittelbar auf dem Substrat mit 1 Tropfen Pufferlösung von p_H 2,79 (1,5 g Weinsäure + 1,9 g Na-Tartrat in 100 ml Wasser) und 1 Tropfen Reagens. Blei ist an dem entstehenden scharlachroten Fleck zu erkennen. — Wenn das Substrat stark gefärbt ist, preßt man ein mit Pufferlösung getränktes Filterpapier auf die zu prüfende Stelle, wartet einige Minuten und bringt dann 1 Tropfen Reagens auf. — Unter den Versuchsbedingungen stören Ag, Hg, Ba und Sn, von denen aber nur Zinn in den in Betracht kommenden Fällen zugegen sein kann. H. Kurtenacker.

---

[1] Analyst (London) **78**, 43—47 (1953). Univ. und General Hospit., Buffalo, N. Y.

[2] J. biol. Chemistry **133**, 669 (1940).

[3] Chemist-Analyst **42**, 64 (1953). Univ. Rio de Janeiro (Brasilien).

Über die toxikologische Analyse einfacher und komplexer Cyanide, die in der Galvanotechnik gebraucht werden, berichtet S. Bieg[1]. Verf. schlägt vor, bei der toxikologischen Untersuchung stets auch mit Natriumhydrogencarbonat zu destillieren, da selbst bei Abwesenheit von Blutlaugensalzen andere komplexe Schwermetallcyanide vorhanden sein können, die bei der Destillation aus saurer Lösung Blausäure abgeben. Bei der Destillation aus hydrogencarbonatalkalischer Lösung wird nur aus den Alkalicyaniden und den leicht zersetzlichen komplexen Cyaniden HCN freigemacht (etwa 73—77% aus KCN und den Zn- und Cd-Salzen, 52% aus dem Hg-Salz, 13,6% aus dem Cu-Salz). $Hg(CN)_2$ und die komplexen Cyanide $KAg(CN)_2$, $KAu(CN)_2$, $K_4Fe(CN)_6$, $K_3Fe(CN)_6$, $K_2Ni(CN)_4$ werden dabei nicht zersetzt. — In mit Schwefelsäure angesäuerter Lösung werden unter Durchleiten von CO_2 bei 90—95° C KCN und die komplexen Cyanide von Zn, Cd, Cu und Ni rasch und quantitativ zersetzt, bei etwas längerer Destillationsdauer auch die Salze von Ag und Fe. Das Hg-Salz gibt nur etwa 80%, das Au-Salz etwa die Hälfte der vorhandenen Blausäure ab. Eine zuverlässige Beurteilung des Analysenergebnisses ist bei Anwesenheit komplexer Schwermetallcyanide nur dann möglich, wenn Art und Menge der vorhandenen Schwermetalle bekannt sind. H. Sperlich.

Über die toxikologische Bestimmung von Strychnin in Organteilen berichten W. Roth, L. Arrigoni und L. Fischer[2]. — *Arbeitsweise.* 10 g zerkleinerte Leber werden mit 1 g Pancreatin, 0,4 g Natriumcarbonat und 20 ml Wasser gründlich vermischt und 24 Std im Brutschrank bei 37° C gehalten. Nach den ersten 12 Std wird die Mischung mit 0,5 n Natronlauge auf p_H 8 eingestellt. Nach Beendigung des enzymatischen Aufschlusses überführt man die Mischung in einen 250 ml-Meßkolben, spült erst mit Wasser und dann zweimal mit je 30 ml 3%iger Essigsäure nach und füllt bis zur Marke auf, nachdem man den Schaum durch Zugabe weniger Tropfen Äther beseitigt hat. Nach dem Mischen filtriert man und dampft 10—50 ml Filtrat (entsprechend 0,02—0,04 mg Strychnin) auf dem Wasserbad zur Trockne ein. Der Rückstand wird mit 0,5—1,0 ml 15%iger Sodalösung aufgenommen, mit 10 ml Benzol versetzt und 3—4 min kräftig durchgerührt. Man dekantiert die Benzolschicht und wiederholt diese Extraktion dreimal. Die vereinigten Benzolextrakte werden in einem 50 ml-Becherglas zur Trockne eingedampft, dann mit 2 ml Salzsäure und 2 g Zinkgranulat versetzt und bedeckt 10 min auf dem Wasserbad erwärmt. Nach weiterer Zugabe von 2 ml Salzsäure läßt man noch 10 min reduzieren, kühlt ab und dekantiert in eine 10 ml-Meßflasche. Nach dem Nachwaschen gibt man 0,5 ml Salzsäure und 1 Tropfen 0,1%ige Natriumnitritlösung zu und füllt bis zur Marke auf. Dann mißt man die Extinktion der entstandenen Farblösung bei 530 mμ. Zur Aufstellung einer Eichkurve werden je 2 ml von Lösungen, enthaltend 0,01—0,06 mg Strychnin, wie oben beschrieben, mit Zink und Salzsäure reduziert und weiter behandelt. Nach den Beleganalysen wurden bei Strychninmengen von 0,1—1,0 mg durchschnittlich 98,9% wiedergefunden. H. Sperlich.

Druckfehlerberichtigung.

Im Referat E. W. Neuhoff und H. Auterhoff „*Zur Analytik der Rhabarberdrogen*“[3] ist in der 3. und 9. Zeile „ml“ durch „μl“ zu ersetzen.

---

[1] Dtsch. Apotheker-Ztg. **93**, 428—431 (1953). Staatl. Anst. Lebensm.-Unt., Ulm/Donau.

[2] J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit., **42**, 308—310 (1953). Univ. Seattle, Wash.

[3] Diese Z. **144**, 447 (1955).